

Aus dem Institut für Pathologie
Direktor: Professor Dr. Christoph Röcken
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Zur Bedeutung von PPAR β/δ in der Atherosklerose und Restenose
unter besonderer Berücksichtigung peripherer restenotischer
Läsionen**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Marlen Wilhelm

aus

Lüneburg

Kiel, 2013

1. Berichterstatter: PD Dr. Bräsen

2. Berichtersteller: Prof. Dr. Kunzendorf

Tag der mündlichen
Prüfung: 19.11.2013

Zum Druck
genehmigt, Kiel, den _____

gez. _____

Inhaltsverzeichnis

1 Abkürzungsverzeichnis

2	Einleitung	1
2.1	Atherosklerose und Restenose	1
2.2	Periphere arterielle Verschlusskrankheit	2
2.3	Peroxisome-Proliferator-Activated-Receptor (PPAR) β/δ	4
2.4	Zielsetzung	4
3	Material und Methoden	5
3.1	Tiermodell	5
3.2	Humane Proben	5
3.2.1	Stent-tragende humane Koronar- und Beinarterien	5
3.2.2	Atherektomien aus peripheren Arterien	6
3.3	Histologische Aufbereitung	6
3.3.1	Atherektomie-Proben	6
3.3.2	Stent-tragende Proben	7
3.3.2.1	Vorbehandlung und Polymerisation	8
3.3.2.2	Mikrotomie	8
3.3.2.3	Sägeschliff-Präparate	8
3.4	Färbungen	9
3.4.1	Histochemische Färbungen	9
3.4.1.1	Oberflächenfärbung mit Toluidinblau	9
3.4.1.2	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	9
3.4.1.3	Kombinierte Masson-Goldner-, Elastika- van Gieson-, von Kossa-Färbung	9
3.4.2	Immunhistochemische Färbungen	9
3.4.2.1	TUNEL-Methode	12
3.4.2.2	Immunhistochemische Mehrfachmarkierungen	13
3.5	Datenerhebung	14
3.5.1	Digitale Bildanalyse	14
3.5.1.1	Gefäßwandaufbau	15
3.5.1.2	Zusammensetzung der Gefäßläsion	16

3.5.1.3 Positive Zellkerne	16
3.5.2 Manuelle Bildanalyse	16
3.5.3 Statistik	18
4 Ergebnisse	19
4.1 Morphologie der Restenose in Stent-tragenden humanen Beinarterien	19
4.2 Humane Koronararterien	21
4.3 Auswirkung einer PPAR β/δ -Aktivierung auf die experimentelle Restenose	23
4.3.1 Ausmaß der In-Stent-Restenose	24
4.3.2 Proliferative Aktivität in der experimentellen Restenose	25
4.3.3 Re-Endothelialisierung	25
4.3.4 PPAR β/δ -Expression	26
4.4 Humane Atherektomien	28
4.4.1 Kollektivbildung	28
4.4.2 Morphologische Analysen	29
4.4.2.1 Zusammensetzung des Gewebes	29
4.4.2.2 PPAR β/δ -Expression	31
4.4.2.3 Glatte Muskelzellen	37
4.4.2.4 Makrophagen	39
4.4.2.5 Kapillarisierung	41
5 Diskussion	42
5.1 Methodenkritik	42
5.1.1 Tiermodell	42
5.1.2 Humane Atherektomien	42
5.2 Bedeutung von PPAR β/δ für atherosklerotische und restenotische Läsionen	43
5.2.1 Einfluss von PPAR β/δ auf die Entwicklung restenotischer Läsionen	43
5.2.2 Hochregulation von PPAR β/δ nach vaskulären Läsionen	46
5.2.3 Expression von PPAR β/δ in humanem Atherektomie-Gewebe	47

6 Zusammenfassung	49
7 Literaturverzeichnis	51
8 Anhang	58
8.1 Einbettprotokolle	58
8.1.1 Technovit [®] 9100 NEU	58
8.2 Färbeprotokolle	59
8.2.1 PBS	59
8.2.2 DAB	59
8.2.3 TUNEL-Methode	59
8.2.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung	60
8.2.5 Kombinierte Masson-Goldner-, Elastika-van Gieson-, von Kossa-Färbung	60
Danksagung	62
Erklärung	63
Lebenslauf	65

1 Abkürzungsverzeichnis

ABI	Ankle-Brachial-Index
BMS	Bare-Metal-Stents
CCL 21	Chemokine (C-C motif) Ligand 21
CLI	Critical Limb Ischemia
CRP	C-reaktives Protein
CXCL 7	Chemokine (C-X-C motif) Ligand 7
DAB	3,3'-Diaminobenzidine
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DES	Drug-eluting Stents
ERK 1/2	Extracellular-Signal-Regulated Kinases 1/2
EZM	Extrazelluläre Matrix
Fem-pop	Femoral-popliteal
HE	Hämatoxylin-Eosin
HRP	Horseraddish Peroxidase
IDDM	Insulin-Dependent Diabetes Mellitus
IL-1 β	Interleukin-1 β
ISR	In-Stent-Restenose
ISRR	In-Stent-Re-Restenose
LDL	Low-Density-Lipoprotein
KHK	Koronare Herzkrankheit
MAP-Kinase	Mitogen-activated-Proteinkinase
MCP-1	Monocyte Chemotactic Protein 1
MRC	Multi-Resistant-Coating
MW	Mittelwert
NIDDM	Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus
pAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	Phosphate Buffered Saline
PECAM	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule

PIS	Post-Interventions-Restenose
PPAR	Peroxisome-Proliferator-Activated-Receptor
PTA	Perkutane Transluminale Angioplastie
SMA	Smooth Muscle Actine
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor α
TUNEL	Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Mediated dUTP Nick End Labeling Assay
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule 1
VSMC	Vascular Smooth Muscle Cell

2 Einleitung

Führende Todesursachen in der westlichen Welt sind kardiovaskuläre Erkrankungen wie die koronare Herzkrankheit (KHK), die periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) oder cerebrovaskuläre Erkrankungen. Laut Statistischem Bundesamt sind 2009 insgesamt 350 000 Menschen an dieser Gruppe von Erkrankungen verstorben (Statistisches Bundesamt 2010). Ursächlich hierfür sind in erster Linie atherosklerotische Veränderungen der Gefäßwand. In der vorliegenden Dissertationsarbeit wurde die Rolle des Transkriptionsfaktors PPAR β/δ sowohl für atherosklerotische als auch für restenotische Läsionen untersucht, wobei besonderes Augenmerk auf die periphere arterielle Verschlusskrankheit gerichtet wurde.

2.1 Atherosklerose und Restenose

Die Atherosklerose ist eine chronische Erkrankung der Arterienwand, deren Pathogenese eine Kombination aus Endotheldysfunktion (Libby et al. 2006) und Entzündungsreaktionen (Libby et al. 2002) im Zusammenspiel mit klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren wie Dyslipidämie, Diabetes mellitus oder arteriellem Hypertonus beinhaltet (Libby et al. 2011; Chapman 2006; Beckman et al. 2002; Eckel et al. 2002). Zentraler Prozess ist hierbei die Adhäsion und Einwanderung von Leukozyten, die Differenzierung zu Makrophagen, Aufnahme von Lipiden und die Akkumulation als Schaumzellen in der Intima. Parallel dazu kommt es zu einer Änderung der Endothel-Permeabilität, zum Eintritt von LDL-Partikeln in die Arterienwand und zur intrazellulären Cholesterin-Akkumulation. Durch die Rekrutierung von glatten Muskelzellen der Gefäßwand (VSMCs) und die Produktion von extrazellulärer Matrix (EZM) entsteht die typische risikoreiche Läsion, die aus einem Atheromkern und diesen zum Lumen hin begrenzender fibröser Kappe besteht (Libby 2003; Libby et al. 2011). Klinische Manifestation dieser Plaques sind dann fluss-limitierende Stenosen und thrombotische Verschlüsse durch die Ruptur der fibrösen Kappe (Libby 2009).

Die Atherosklerose ist grundsätzlich abzugrenzen zur Restenose, die als das Wiederauftreten klinischer Symptomatik oder als der angiographische Nachweis einer erneuten Lumeneinengung nach operativen Prozeduren oder interventionellen Eingriffen wie der koronaren oder peripheren Angioplastie mit oder ohne Stentimplantation definiert ist. In Anlehnung an das Modell zur Pathophysiologie der Restenose,

das 1991 von Forrester und Kollegen (Forrester et al. 1991) auf der Basis der Wundheilungs-Mechanismen erstellt wurde, geht man heute von einem dreiphasigen Prozess aus (Welt und Rogers 2002). Die Verletzung des Endothels, atherosklerotischer Plaques und der Media durch den interventionellen Eingriff bedingt zunächst eine inflammatorische Phase (Stunden bis Tage), die mit einer Aktivierung von Thrombozyten und Migration von Leukozyten einhergeht. Diese Entzündung wiederum führt zur Proliferation und zur Migration glatter Muskelzellen der Gefäßwand (VSMCs) aus der Media in die Neointima, die sich innerhalb weniger Wochen aus VSMCs, Makrophagen und extrazellulärer Matrix (EZM) bildet (Neointima-Hyperplasie). Die sich anschließende Phase des Remodelings ist gekennzeichnet durch die Produktion extrazellulärer Matrix. Das Verhältnis Zellen/EZM verschiebt sich zugunsten der EZM, und es kommt im weiteren Verlauf zu einer Schrumpfung der Arterie. Diese narbige Schrumpfung wird als negatives Remodeling bezeichnet (Farb et al. 2004). Als zentraler Prozess, vor allem der In-Stent-Restenose, wurde dabei, anders als bei der Atherogenese, die Neointima-Hyperplasie identifiziert (Inoue und Node 2009), die wesentlich von inflammatorischen Reaktionen der Gefäßwand sowie vom Ausmaß der Endothelverletzung abhängt (Costa und Simon 2005; Patel et al. 2010).

2.2 Periphere arterielle Verschlusskrankheit

Eine der häufigsten atherosklerotischen Manifestationen ist die periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK). Etwa 27 Millionen Menschen in Europa und den USA sind von dieser Erkrankung betroffen (Brevetti et al. 2010; Hirsch et al. 2001). Die Prävalenz einer symptomatischen pAVK in Deutschland liegt derzeit bei etwa 1,8 Millionen Deutschen, von denen jährlich 50 000 bis 80 000 eine chronische kritische Extremitätenischämie (CLI) entwickeln (Dohmen et al. 2012; Norgren et al. 2007). Die klinische Signifikanz dieser Erkrankung ergibt sich neben der Morbidität aus der prognostischen Bedeutung der pAVK für das Mortalitätsrisiko betroffener Patienten. So konnte gezeigt werden, dass der Ankle-Brachial-Index (ABI) nicht nur für die Diagnostik der pAVK, sondern auch als Prädiktor für ein hohes kardiovaskuläres Mortalitätsrisiko eine entscheidende Rolle spielt. Eine Reduktion des $ABI \leq 0,9$ gilt zum einen als starker Indikator für das Vorhandensein einer pAVK (Feigelson et al. 1994), zum anderen verdoppelt sich das 10-Jahres-Risiko für (kardiovaskuläre) Mortalität und kardiale Ereignisse (Fowkes et al. 2008). Beim Vorliegen einer CLI leben 10 Jah-

re nach Diagnosestellung nur noch 8% der Patienten (Hirsch et al. 2006). Als Ursache für diesen Zusammenhang werden in der Literatur vor allem systemische und lokale Entzündungsreaktionen diskutiert (Brevetti et al. 2010).

Therapeutisch sind je nach Stromgebiet ab Stadium IIb beziehungsweise Stadium III nach Fontaine Revaskularisationsmaßnahmen indiziert. Erfolgskriterien sind hierbei bei Patienten im Claudicatio-Stadium die langfristige Offenheitsrate der Revaskularisation, beim Vorliegen einer CLI der Beinerhalt (Dohmen et al. 2012). Bei der Entscheidung, ob hierbei offen chirurgisch oder perkutan interventionell vorgegangen wird, dienen die TASC II- Empfehlungen (Norgren et al. 2007) als Orientierung.

Seit den 1990er Jahren nehmen interventionelle Verfahren einen zunehmenden Stellenwert ein und werden heute bei der Therapie von infrapoplitealen Läsionen im Claudicatio-Stadium als Goldstandard betrachtet (Lee und Kent 2008; Karnabatidis et al. 2009). Bei der CLI ist die Datenlage diesbezüglich noch nicht ausreichend (Dohmen et al. 2012). Therapielimitierend sind jedoch hohe Restenoseraten, die deutlich über den Restenoseraten in der interventionellen Kardiologie liegen (Hill et al. 2004). Bei Restenoseraten zwischen 50 und 75% im ersten Jahr nach Stentimplantation in der peripheren Strombahn wurde in jüngerer Zeit der Einsatz von Drug-eluting Stents (DES) untersucht (Rogers und Laird 2007; Bosiers et al. 2011b). Während diese in den Koronararterien zu einer Senkung der Restenoseraten auf unter 5% geführt haben (Moses et al. 2003; Weisz et al. 2009; Roiron et al. 2006), werden DES in infrapoplitealen Läsionen zwar als vorteilhaft gegenüber Bare-Metal-Stents (BMS) beurteilt, erreichen aber nur eine Absenkung der Restenoseraten auf etwa 20% (Bosiers et al. 2011a; Bosiers et al. 2011b). In der Therapie von suprapoplitealen Läsionen haben sich DES noch nicht als sicher vorteilhaft etabliert, Studienergebnisse sind aber viel versprechend (Minar 2011).

Weitere Therapieoptionen sind Verfahren wie die Kryoplastie, Laser Angioplastie oder Atherektomien. Letztere sind in den letzten Jahren aufgrund der Entwicklung neuer Technologien wieder interessant geworden (Rogers und Laird 2007). Bisher konnte der Atherektomie jedoch keine Überlegenheit gegenüber der PTA mit oder ohne Stentimplantation nachgewiesen werden (Garcia und Lyden 2009; vom Dahl et al. 2002). Interessant ist jedoch die Möglichkeit einer wissenschaftlichen Nutzung des dabei gewonnenen Materials.

2.3 Peroxisome-Proliferator-Activated-Receptor β/δ

PPAR β/δ gehört, ebenso wie PPAR α und γ zur Superfamilie der Liganden-abhängigen nukleären Rezeptoren. Als Transkriptionsfaktoren agierend hat die Gruppe der PPARs unter anderem Einfluss auf den Fett- und Glukosestoffwechsel, sowie auf Zellwachstum- und differenzierung, Entzündungsreaktionen und das Immunsystem (Bishop-Bailey und Bystrom 2009). Die biologische und pathophysiologische Rolle von PPAR α und γ wurde in den letzten Jahren extensiv erforscht, so dass beide Rezeptoren bereits Angriffspunkte in der pharmakologischen Therapie der Dyslipidämien und des Diabetes mellitus Typ 2 sind. Die Funktion von PPAR β/δ , obwohl anders als PPAR α und γ nahezu ubiquitär exprimiert, ist dagegen nicht genau charakterisiert.

Schon länger bekannt ist die Rolle von PPAR β/δ bei Wundheilung und Plazentafunktion (Tan et al. 2001; Barak et al. 2002; Peters et al. 2000). Eine Beteiligung bei metabolischen Prozessen wie dem Fett- und Glucosestoffwechsel sowie atherogenen Prozessen ist seit einigen Jahren Gegenstand der Forschung. Hier zeigten sich vielversprechende Ergebnisse hinsichtlich möglicher anti-atherogener und anti-restenotischer Eigenschaften von PPAR β/δ (Wang 2008): So konnten zum einen positive Effekte auf Dyslipidämien und Insulinsensitivität nachgewiesen werden (Leibowitz et al. 2000; Sprecher et al. 2007). Zum anderen direkt anti-inflammatorische und anti-proliferative Effekte an der Gefäßwand (Graham et al. 2005; Fan et al. 2008; Liou et al. 2006; Lim et al. 2009).

2.3 Zielsetzung

Die Restenose ist eine der wichtigsten limitierenden Komplikationen in der Therapie der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit, einer der häufigsten atherosklerotischen Manifestationen. Der Transkriptionsfaktor PPAR β/δ scheint nach bisheriger Studienlage neben einem regulierenden Einfluss auf Prozesse im Fett- und Glucosestoffwechsel auch einen direkten Effekt auf die Gefäßwand zu haben.

In der vorliegenden Dissertationsarbeit wurde sowohl die Auswirkung einer Aktivierung von PPAR β/δ auf die experimentelle Restenose als auch die Expression von PPAR β/δ in peripheren humanen atherosklerotischen und restenotischen Läsionen, insbesondere der Beinarterien, untersucht.

3 Material und Methoden

In der vorliegenden Arbeit wurden im Rahmen eines Kooperationsprojektes mit PD Dr. Florian Blaschke (Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Kardiologie, Charité, Humboldt Universität, Berlin), Dr. Olli Leppänen (Ludwig Institut for Cancer Research, Universität Uppsala, Schweden) und Prof. Seppo Ylä-Herttuala (A. I. Virtanen Institut, Universität Kuopio, Finnland) sowohl Proben aus Tierversuchen als auch humanes Gewebe untersucht.

3.1 Tierversuche

Zur In-vivo-Untersuchung der Bedeutung von PPAR β/δ für die In-Stent-Restenose wurde ein Tiermodell genutzt, bei dem PPAR β/δ -Agonist-beschichtete Stents in Kaninchenarterien eingebracht wurden.

Die Tierversuche wurden am A. I. Virtanen Institut der Universität Kuopio, Finnland nach Bewilligung entsprechender Ethikanträge durchgeführt.

Dabei wurde an insgesamt 24 New-Zealand-White-Kaninchen nach Fütterung mit einer Standard-Diät eine Denudation der Aorta mit einem Fogerty-Katheter und anschließende Stent-Platzierung (YUKON® Choice^{DES}, Translumina GmbH, Hechingen, Deutschland) vorgenommen. Randomisiert wurde den Tieren entweder ein PPAR β/δ -Agonist (GW0742)-beschichteter Stent in zwei unterschiedlichen Dosierungen, oder als Kontrollgruppe ein mit einer Trägersubstanz (Dimethylsulfoxid) beschichteter Stent implantiert.

Nach 14 beziehungsweise 42 Tagen erfolgte nach Euthanasie der Kaninchen mittels Barbituratgabe die Entnahme der Stent-tragenden Gefäßsegmente en bloc und die Fixierung in 4% neutral gepuffertem Formalin.

3.2 Humane Proben

3.2.1 Stent-tragende humane Koronar- und Beinarterien

Zum einen wurde die Expression von PPAR β/δ in einem bereits charakterisierten Kollektiv humaner Koronararterien (Bräsen et al. 2001) analysiert.

Zum anderen wurden Stent-tragende Beinarterien aus Beinamputaten untersucht, die dem Routine-Eingang des Instituts für Pathologie, UKSH, Campus Kiel entstammten.

3.2.2 Atherektomien aus peripheren Arterien

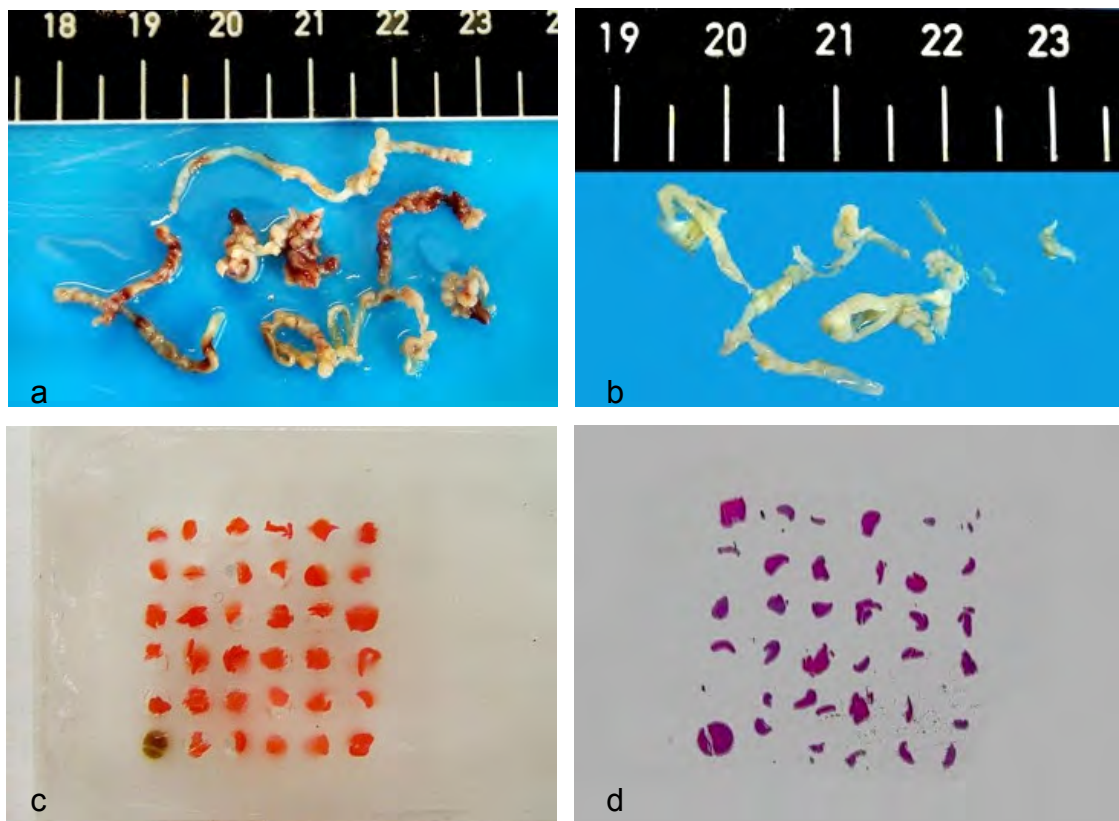
Zur weiteren Untersuchung der Expression von PPAR β/δ wurden darüber hinaus Atherektomie-Proben aus humanen Beinarterien analysiert. Diese stammten aus Interventionen mit dem SilverHawk® Plaque Excision System (ev3 Endovascular, Plymouth, USA) aus dem Herzzentrum Bad Krozingen an Patienten mit peripherer arterieller Verschlusskrankheit.

Hierbei wurden atherosklerotische und restenotische Läsionen im Bereich der Iliakal-, Femoral-, Popliteal- und der Unterschenkelgefäße entfernt. Das entnommene Material entstammte dabei Läsionen, die neu aufgetreten waren (Denovo-Läsion), die sich innerhalb eines vorplatzierten Stents erneut gebildet hatten (In-Stent-Restenose und In-Stent-Re-Restenose) oder Läsionen, die nach einer vorangegangenen Intervention ohne Stentimplantation wieder aufgetreten waren (Post-Interventions-Restenose), aber auch aus unklaren oder gemischten Läsionen. Die Proben waren dabei zunächst in 4%-iger Formalinlösung fixiert und nach 24 h in 70% Ethanol verschickt worden.

3.3 **Histologische Aufarbeitung**

3.3.1 Atherektomie-Proben

Das fixierte Gewebe wurde im Einbettautomaten (STP, Thermo Scientific, Walldorf, Deutschland) in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert (70%, 96%, 4x 100%, 4x Xylol) und mit Paraffin (Mediate, Burgdorf, Deutschland) infiltriert. Das Gewebe wurde dann per Hand in vorgegossene Paraffinblöcke eingebracht. Dafür wurden die einzelnen durch die Atherektomie ausgeschälten Gewebestränge in 3 mm lange Segmente geteilt und diese dann mit einer Pinzette senkrecht in die vorbereiteten Paraffinblöcke eingebracht. Pro Block wurden je nach Materialmenge zwischen 10 und 30 Gewebestücke eines Patienten eingebettet. Pro Patient wurden bis zu vier Paraffinblöcke benötigt, um das gesamte vorhandene Material einzubetten (vgl. Abb. 3.1)

Abb. 3.1: Einbettung der Atherektomie-Proben

Die **Abb. 3.1 a, b** zeigen jeweils die fixierten Atherektomie-Proben. Nach Segmentierung wurde das Gewebe senkrecht in Paraffinblöcke eingebracht (**c**), zu Gewebeschnitten verarbeitet und gefärbt (**d**: HE-gefärbter Gewebeschnitt).

Mittels Rotationsmikrotom (Thermo Scientific, Fremont, USA) wurden nun 2-5 μm dicke Gewebeschnitte angefertigt und in einem Wasserbad (Medite, Burgdorf, Deutschland) auf Glasobjektträger gezogen. Hierbei wurden für Schnitte, die immunhistochemisch gefärbt werden sollten, Superfrost®-Plus-Objektträger (Thermo Scientific, Fremont, USA) verwendet und die aufgezogenen Schnitte über Nacht luftgetrocknet. Paraffinschnitte, die unter anderem Hämatoxylin-Eosin-gefärbt werden sollten, wurden auf unbeschichtete Glasobjektträger (Hecht Assistent, Sondheim, Deutschland) aufgezogen und dann für 15 min bei 50-60°C im Brutschrank (Medax, Kiel, Deutschland) getrocknet.

3.3.2 Stent-tragende Proben

Die histologische Aufarbeitung der Stent-tragenden Proben erforderte die Herstellung von Hartgewebsschnitten und Sägeschliff-Präparaten. Dafür wurde das Gewebe in ein Methylmethacrylat-Polymer eingebracht, das die Untersuchung von Metallimplan-

taten in situ, inklusive Immunhistochemie und entsprechender Gewebereaktionen ermöglicht (Technovit® 9100 NEU Heraeus Kulzer, Hanau, Deutschland).

3.3.2.1 Vorbehandlung und Polymerisation

Die Vorbehandlung des Gewebes und das Ansetzen der Polymerisationslösungen erfolgte dabei nach dem Protokoll des Herstellers (Heraeus Kulzer, Hanau, Deutschland) (s. Anhang).

Zur Polymerisation wurde das vorbehandelte Gewebe dann in Polypropylenformen (Heraeus Kulzer, Hanau, Deutschland) gelegt und mit dem Polymerisationsgemisch langsam randvoll übergossen, anschließend im Exsikkator für 10 min evakuiert, luftdicht verschlossen und für 1-2 d im Gefrierschrank mit angeschlossenenem Temperaturregler bei exakt -4°C ausgehärtet. Danach wurden die Proben auf Raumtemperatur erwärmt und aus den Polypropylenformen genommen.

3.3.2.2 Mikrotomie

Die Herstellung von 2-5 µm dicken Hartgewebsschnitten erfolgte an einem Rotations-Tischmikrotom (Jung, Heidelberg, Deutschland) mit einem 16 cm-Hartmetallmesser mit D-Schliff unter Verwendung von 30%-igem Ethanol als Schneideflüssigkeit. Die Schnittrichtung erfolgte dabei quer zur Arterienlängsachse, um das Gefäß im Querschnitt abzubilden. Die Schnitte wurden dann auf Chromalaun-beschichtete Glas-Objektträger aufgezogen. Die Chromalaunbeschichtung diente dabei der besseren Haftung der Hartgewebsschnitte. Nach Streckung der Schnitte mit 50%-igem Ethanol und Abdeckung der Objektträger mit Kisolfolie folgte die Trocknung über Nacht in einer Schnittpresse (Enno Vieth, Wiesmoor, Deutschland) bei 50°C.

3.3.2.3 Sägeschliff-Präparate

Zur Herstellung von Sägeschliffen wurden die Kunststoffblöcke zunächst im 90°-Winkel mit der Tischbandsäge (Metabo, Nürtingen, Deutschland) getrimmt, sodass die Arterien im Querschnitt angeschnitten wurden. Die Schnittflächen wurden dann mit Nass-Schleifpapier (P2400 und P4000) auf Schleiftellern (ATM, Mammelzen, Deutschland) poliert und mit Sekundenkleber (Loctite® 493, Henkel, Düsseldorf, Deutschland) auf Kunststoffobjektträger bzw. mit Präzisionskleber (Technovit 7200 VLC, Heraeus Kulzer, Hanau, Deutschland) auf zuvor silanisierte Glasobjektträger aufgeklebt.

Von den aufgeklebten Kunststoffblöcken wurden mit einer Präzisionsbandsäge (EXACT, Remscheid, Deutschland) planparallel 100 µm messende Scheiben abgesägt. Anschließend wurde der Schnitt mit einer Schleifmaschine (EXACT, Remscheid, Deutschland) auf 30-40 µm geschliffen. Danach wurden die Schnitte auf Poliertellern (ATM, Mammelzen, Deutschland) mit zunehmend feinerer Körnung (P500, P1200, P1400, P4000) poliert, bis eine Schnittdicke von 10-20 µm erreicht war.

3.4 Färbungen

3.4.1 Histochemische Färbungen

3.4.1.1 Oberflächenfärbung mit Toluidinblau

Als Übersichtsfärbung der Stent-tragenden Gewebeschnitte wurde an den entsprechenden Sägeschliffpräparaten eine Oberflächenfärbung mit Toluidinblau vorgenommen. Die Färbung erfolgte dabei nach dem Protokoll von Romeis (Romeis und Boeck 1989) (s. Anhang).

3.4.1.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Als Übersichtsfärbung der Atherektomien diente die HE-Färbung, die an den entsprechenden Paraffinschnitten vorgenommen wurde. Die Färbung erfolgte dabei nach dem Protokoll von Romeis (Romeis und Boeck 1989) (s. Anhang).

3.4.1.3 Kombinierte Masson-Goldner-, Elastika-van Gieson-, von Kossa-Färbung

Um simultan Bindegewebe, elastische Fasern, thrombotisches Material und Kalk an einem Schnittpräparat beurteilen zu können, wurden die histochemischen Färbungen nach Masson, Goldner, Elastika, van Gieson und von Kossa kombiniert. Es wurde dabei nach dem Protokoll von Bräsen (Bräsen 1994) vorgegangen (s. Anhang).

3.4.2 Immunhistochemische Färbungen

Zur Analyse sowohl der humanen Proben als auch der Kaninchenarterien wurden verschiedene immunhistochemische Färbungen durchgeführt. Dabei erfolgten die Färbungen der Hartgewebsschnitte alle per Hand, die Färbungen der Paraffinschnitte zum Teil per Hand, zum Teil im vollautomatischen Leica Bond® Max Färbegerät (Leica, Wetzlar, Deutschland).

Zur Entfernung des Einbettmediums wurde für die Hartgewebsschnitte Methoxyethylacetat (Merck, Darmstadt, Deutschland), für die Paraffinschnitte Xylol verwendet. Nach 2x 15 min Entplasten beziehungsweise Entparaffinieren erfolgte zunächst die absteigende Alkoholreihe (3x 100%, 3x 96%, 2x 70%, Leitungswasser) und Spülen in einer PBS-Küvette. Das PBS wurde dabei per Hand angesetzt (Protokoll s. Anhang). Je nach Antikörper erfolgte dann eine Antigendemaskierung durch Kochen in Citratpuffer (Zytomed Systems, Berlin, Deutschland) bei pH6 im Dampfkochtopf für 5 min beziehungsweise bei Färbung im Färbeautomaten eine entsprechende Vorbehandlung bei pH 9 in Bond® Epitope Retrieval Solution (Leica, Wetzlar, Deutschland), eine enzymatische Vorbehandlung mit dem Bond® Enzyme Pretreatment Kit (Leica, Wetzlar, Deutschland), das auch bei Färbungen per Hand verwendet wurde, oder ohne Vorbehandlung (vgl. Tab. 3.1). Nach erneutem Spülen in PBS wurde die endogene Peroxidase in 200 ml Methanol+ 20 ml H₂O₂ (Merck, Darmstadt, Deutschland) für 30 min geblockt, danach wurde wieder in PBS gespült. Anschließend wurden 100 µl des CAS-Block® (Invitrogen, Carlsbad, USA) zur Reduzierung der unspezifischen Hintergrundfärbung aufgetragen, für 30 min belassen und dann abgeklopft. Es erfolgte dann das Aufbringen von 100 µl des primären Antikörpers (vgl. Tab. 3.1) und die Inkubation für 60 min bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer. Die optimale Verdünnung des primären Antikörpers war in Vorversuchen ausgetestet worden und erfolgte direkt vor Verwendung des Antikörpers mit PBS.

Danach wurden die Objektträger wieder in PBS gespült und 100 µl des sekundären Antikörpers (vgl. Tab. 3.2) aufgebracht und für 30 min inkubiert.

Tabelle 3.1: Primäre Antikörper

Antigen	Antikörper	Verdün- nung	Hersteller	Vorbehand- lung
Makrophagen (Rabbit)	Monoclonal Mouse Anti-Rabbit Macrophage Clone RAM 11	1:50	Dako, Glostrup, Dänemark	keine
Ki-67	Monoclonal Rat Anti- Mouse Ki-67 Antigen, Clone TEC-3	1:10	Dako, Glostrup, Dänemark	keine
PECAM-1	PECAM-1 (M-20): sc-1506 goat polyclonal Antibody	1:200	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, USA	keine
PPAR β	PPAR β (k-20): sc-1987 goat polyclonal Antibody	1:50	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, USA	keine
Glattmuskulä- res Aktin	Actin, Smooth Muscle Ab-1 Mouse Monoclonal Antibody	1:400	LabVision, Thermo Scientific, Fremont, USA	Kochen in Citratpuffer pH6
CD68	CD68 Ab-4 Mouse Monoclonal Antibody	1:100	LabVision, Thermo Scientific, Fremont, USA	Kochen in Citratpuffer pH6
Topoisomerase 2 α	KiS1 Mouse Monoclonal Antibody Zellkulturüberstand	1:20	hauseigen	keine
Makrophagen	M1P Mouse Monoclonal Antibody Zellkulturüberstand	1:2	hauseigen	Enzym
CD61 (GPIIIa)	Novocastra® Lyophilized Mouse Monoclonal Antibody CD61	1:50	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland	Kochen in Citratpuffer pH6
Caspase 3	Rabbit Anti-Cleaved Caspase-3 Polyclonal Antibody		BD Pharmingen® Biosciences, New Jersey, USA	keine
CD34	CD34 Monoclonal Antibody Ready-to-use IO Path®	keine	Beckman Coulter, Brea, USA	keine

Tabelle 3.2: Sekundäre Antikörper

Antikörper	Hersteller
N-Histofine® Simple Stain MAX PO (G) anti-goat	Nichirei Corporation, Tokio, Japan
N-Histofine® Simple Stain MAX PO (Multi) anti-mouse and anti-rabbit	Nichirei Corporation, Tokio, Japan
Dako EnVision+ System HRP labelled polymer anti-mouse	Dako, Glostrup, Dänemark
Dako polyclonal rabbit anti-goat immunoglobulins/HRP	Dako, Glostrup, Dänemark
UltraVision LP AP-Polymer anti-mouse, anti-rabbit	LabVision, Thermo Scientific, Fremont, USA
Bond® Polymer Refine Detection	Leica, Wetzlar, Deutschland
Goat anti-rat IgG (H&L) Biotin-gekoppelt	Acris Antibodies, Herford, Deutschland

Nach erneutem Spülen in PBS folgte nun bei Verwendung eines Biotin-gekoppelten sekundären Antikörpers (vgl. Tab. 3.3) ein Zwischenschritt mit dem Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (Dako, Glostrup, Dänemark) für 30 min. Alle anderen verwendeten Antikörper waren HRP-konjugiert, sodass ein solcher Zwischenschritt nicht notwendig war.

Nach Spülen in PBS folgte die Chromogenentwicklung mit 3,3'-Diaminobenzidin (DAB), diese wurde durch Spülen in Leitungswasser gestoppt, sobald das Färbeergebnis unter dem Mikroskop (Leica, Wetzlar, Deutschland) optimal war. Das DAB war dabei direkt vor Verwendung angesetzt worden (Protokoll s. Anhang).

Anschließend wurde die Kerngegenfärbung für 1 s in Hämalun (Merck, Darmstadt, Deutschland) mit anschließendem mehrfachen Schwenken unter fließendem Leitungswasser vorgenommen. Nach Spülen in Aqua dest. erfolgte die aufsteigende Alkoholreihe und das Eindeckeln mit Deckgläschen (Walter CMP, Kiel, Deutschland) und Pertex (Medite, Burgdorf, Deutschland).

3.4.2.1 TUNEL-Methode

Zur In-situ-Detektion von Zellkernen apoptotischer Zellen in Hartgewebsschnitten der Kaninchenarterien wurde das TACS® TdT Kit (R&D Systems, Minneapolis, USA) verwendet. Dieses beruht auf der TUNEL-Methode (Tdt-mediated dUTP-biotin nick

end labeling), die DNA-Fragmente durch das Enzym TdT (terminale desoxynucleotidyl transferase) mit markierten Nukleotiden detektiert.

Dabei wurde das Protokoll des Herstellers befolgt (s. Anhang).

3.4.2.2 Immunhistochemische Mehrfachmarkierungen

Sowohl an Hartgewebsschnitten der Kaninchenarterien als auch an Paraffinschnitten der humanen Atherektomie-Proben wurden im Hellfeld- und Dunkelfeld Mehrfachmarkierungen vorgenommen.

Zur Mehrfachmarkierung im Hellfeld wurde analog zu dem oben beschriebenen Protokoll (vgl. 3.4.2) vorgegangen, wobei jeweils nach Stoppen der Färbereaktion in Leitungswasser das Protokoll erneut beim Peroxidaseblock begonnen wurde. Es wurden die oben beschriebenen Antikörper (vgl. Tab. 3.1) verwendet und bis zu drei verschiedene Antigene an einem Schnitt markiert. So konnten beispielsweise an humanen Paraffinschnitten PPAR β (braun), CD68 (rot) und CD34 (grau), an Hartgewebsschnitten der Kaninchenarterien PPAR β (braun), RAM11 (rot) und SMA (grau) gefärbt werden. Es wurden die in Tabelle 3.3 aufgeführten Farbstoffe verwendet.

Tabelle 3.3 : Chromogene für Hellfeld-Multilabelling

Farbstoff	Farbe	Hersteller
VECTOR NovaRed Peroxidase Substrate Kit	Rot	Vector Laboratories, Burlingame, USA
VECTOR SG Peroxidase Substrate Kit	Grau	Vector Laboratories, Burlingame, USA
DAB Peroxidase Substrate Kit	Braun	Vector Laboratories, Burlingame, USA

Für Mehrfachmarkierungen im Dunkelfeld wurden fluoreszenzgekoppelte Detektionssysteme genutzt. Hierfür folgte nach Entplasten beziehungsweise Entparaffinieren der Schnitte und der absteigenden Alkoholreihe (vgl. 3.3.2) eine enzymatische Vorbehandlung mit dem Bond® Enzym Pretreatment Kit (Leica, Wetzlar, Deutschland) bei 37°C im Brutschrank (Memmert, Schwabach, Deutschland) für 15 min. Nach Spülen in PBS und CAS®Block (vgl. 2.4.2) wurde der primäre Antikörper (vgl. Tab. 3.1) aufgetragen und für 60 min bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach Spülen in PBS wurde ein fluoreszenzgekoppelter sekundärer Antikör-

per aufgetragen (vgl. Tab. 3.4) und für 40 min belassen. Dieser Antikörper war zuvor 1:1 mit Glycerin und dann 1:50 mit PBS verdünnt worden, sodass eine 1:100-Verdünnung vorlag. Für den zweiten und dritten primären Antikörper wurde nun wieder beim CAS®Block begonnen. Nach Auftragen aller drei primären und sekundären Antikörper wurde unter Verwendung von Vectashield Mounting Medium with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Vector Laboratories, Burlingame, USA) eingedeckelt.

Tabelle 3.4: Fluoreszenzgekoppelte sekundäre Antikörper

Sekundärer Antikörper	Hersteller	Farbe
Alexa Fluor® 488 donkey anti-mouse IgG (H+L)	Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, USA	grün
Alexa Fluor® 488 donkey anti-goat IgG (H+L)	Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, USA	grün
Alexa Fluor® 555 donkey anti-mouse IgG (H+L)	Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, USA	rot
Alexa Fluor® 555 donkey anti-goat IgG (H+L)	Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, USA	rot
Alexa Fluor® 647 donkey anti-mouse IgG (H+L)	Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, USA	gelb
Alexa Fluor® 647 donkey anti-goat IgG (H+L)	Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, USA	gelb

3.5 Datenerhebung

Zur Auswertung der histochemischen und immunhistochemischen Färbungen wurde vor allem die digitale Bildanalyse genutzt, aber auch die manuelle Bildanalyse durch Auszählen per Hand unter dem Lichtmikroskop kam zur Anwendung.

3.5.1 Digitale Bildanalyse

Zur digitalen Bildanalyse histochemischer und immunhistochemischer Färbungen wurde eine Morphometrieeinheit bestehend aus einem Mikroskop (Zeiss, Oberkochen, Deutschland), einer MRC-Digitalkamera (Zeiss, Oberkochen, Deutschland), ei-

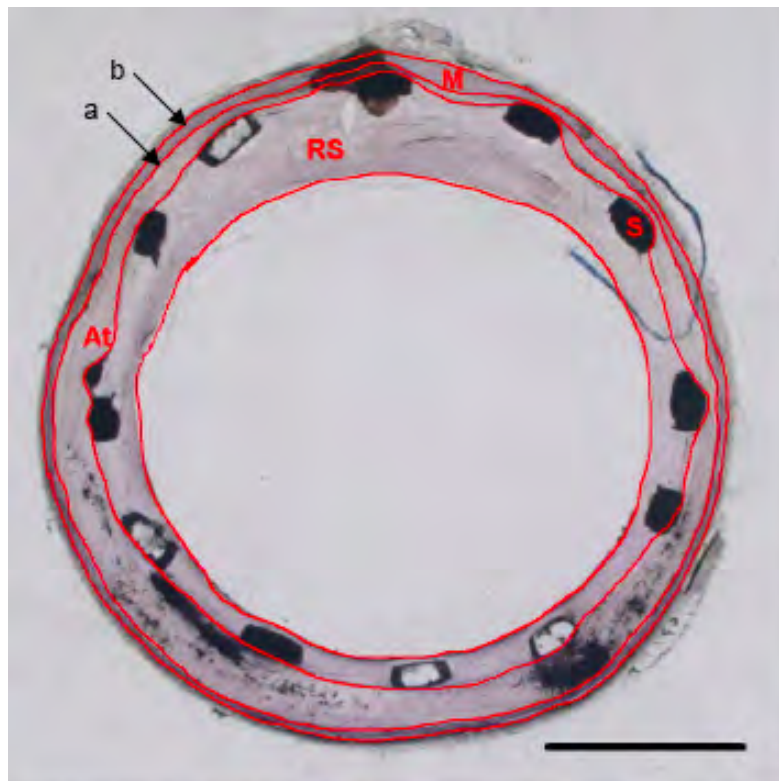
nem daran angeschlossenen Computer und entsprechender Software (Zeiss Axiovision Rel. 4.2.) verwendet.

Zunächst wurde der Gewebeschnitt in je nach Zielobjekt unterschiedlicher Vergrößerung (5x, 10x, 20x) digitalisiert und mit der AxioVision Software binarisiert. Für die zu erfassenden Parameter waren zuvor spezielle Makros geschrieben worden, mit denen die folgenden Parameter quantifiziert wurden: Planimetrie der Gefäßwand, Anteil immunhistochemisch gefärbter Flächen sowie Anteil positiv gefärbter Zellkerne an der Gesamtzellkernzahl.

3.5.1.1 Gefäßwandaufbau

Zur Erfassung des Gefäßwandaufbaus der Stent-tragenden Kaninchenarterien wurden alle Toluidinblau-gefärbten Sägeschliffpräparate in 1.25x Vergrößerung digitalisiert und planimetrisch erfasst. Dabei wurden jeweils interaktiv die Wandabschnitte Neointima (Restenose), Intima (Atherosklerose) und Media markiert, digital vermessen und in mm² angegeben (vgl. Abb. 3.2).

Abb. 3.2: Planimetrie der Kaninchenarterien



Die **Abb. 3.2** zeigt die planimetrische Erfassung der Gefäßwand der Stent-tragenden Kaninchenarterien (**S**: Stent-Strut). Jeweils einzeln vermessen wurden die Restenose (**RS**), die Atherosklerose (**At**) innerhalb der Lamina elastica interna (Pfeil a), und die Media (**M**), die durch die Lamina elastica externa (Pfeil b) begrenzt wird. (Vergrößerung 1,25, Messbalken: 1mm)

3.5.1.2 Zusammensetzung der Gefäßläsionen

Um die Zusammensetzung der Gefäßläsionen sowohl der humanen Atherektomien als auch der Stent-tragenden Kaninchenarterien zu analysieren, wurden die entsprechend histochemisch und immunhistochemisch gefärbten Gewebeschnitte in 10- bis 20-facher Vergrößerung digitalisiert und die farbig abgrenzbaren Zielflächen interaktiv markiert. Diese wurden dann entweder auf den Gesamtquerschnitt oder auf zuvor definierte Bereiche wie die Neointima, die Intima oder die Media bezogen und in Flächenanteilen angegeben.

So konnten zum einen anhand der kombinierten Masson-Goldner-Elastika-Kossa-Färbung die Flächenanteile von Bindegewebe, elastischen Fasern, Fibrin und Kalk der humanen Atherektomien quantifiziert werden (vgl. Abb. 3.3). Zum anderen konnten anhand der immunhistochemischen Färbungen die Flächenanteile von glatter Muskulatur und Makrophagen sowie die Endothelialisierung sowohl der humanen Atherektomien als auch der Kaninchenarterien erfasst werden.

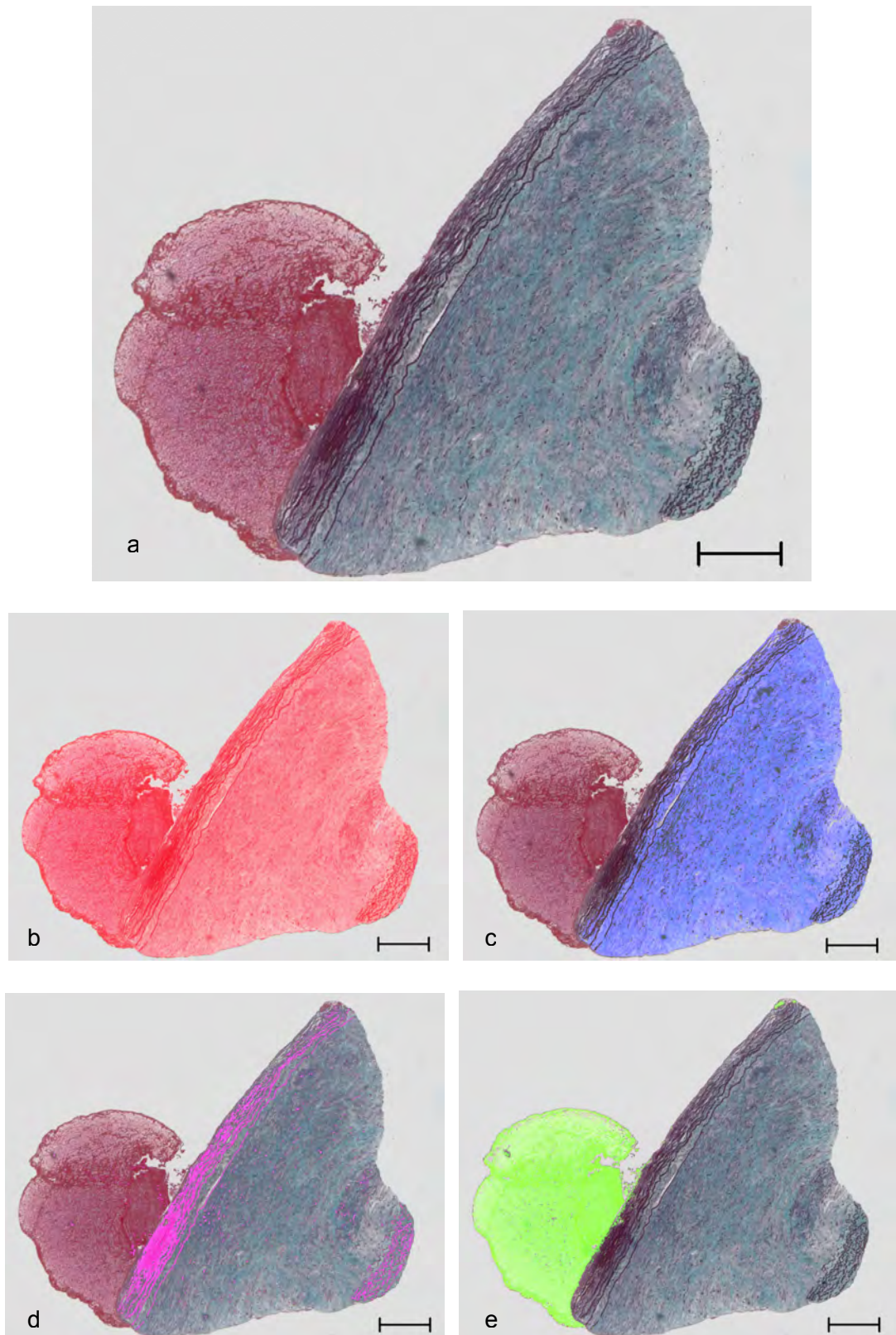
3.5.1.3 Positive Zellkerne

Zur Erfassung der Expression des Transkriptionsfaktors PPAR β/δ in den humanen Atherektomie-Proben wurden die entsprechend immunhistochemisch gefärbten Gewebeschnitte unter 10-facher Vergrößerung digitalisiert und ausgezählt. Dafür wurden in einem zuvor geschrieben Makro sowohl die Größe der zu messenden Objekte als auch die Farbwerte festgelegt. So konnte zum einen die Gesamtkernzahl, zum anderen die immunhistochemisch positive Kernzahl automatisch ermittelt und als Prozentsatz angegeben werden.

3.5.2 Manuelle Bildanalyse

Bis auf die digitale Analyse der PPAR β/δ -Expression in den humanen Atherektomien wurden alle weiteren Kernfärbungen (KiS1, Ki67, Caspase 3, TUNEL) manuell ausgewertet. Unter dem Lichtmikroskop bei 10- bis 20-facher Vergrößerung wurden die positiven Zellkerne ausgezählt und auf die Gesamtzellkernzahl oder die Gesamtfläche des Gewebeschnittes bezogen.

Auch die Analyse der CD34-Färbung an den humanen Atherektomien erfolgte ausschließlich manuell durch Auszählen aller Gewebeschnitte auf einem Objektträger, die eine positive Kapillar- oder Oberflächenendothelfärbung aufwiesen.

Abb. 3.3.: Erfassung der Zusammensetzung der Gefäßläsion

Die **Abb. 3.3 a-e** zeigen die computergestützte Erfassung der Flächenanteile von Bindegewebe, elastischen Fasern und Fibrin. Das Masson-Goldner-, Elastika-van Gieson-, von Kossa-gefärbte Gewebe (**Abb. 3.3 a**: Bindegewebe: grün, elastische Fasern: schwarz-violett, Fibrin: rot) wird zunächst in seiner Gesamtfläche (rot) und dann jeweils Bindegewebe (blau), elastische Fasern (pink) und Fibrin (grün) digitalisiert und erfasst. (Vergrößerung 4x, Messbalken: 0,8 mm)

3.5.3 Statistik

Zur statistischen Analyse der morphologischen Ergebnisse wurde die Statistik-Software Statistica (StatSoft®, Tulsa, USA) verwendet.

Hierbei wurden die Datensätze zunächst mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test auf ihre Normalverteilung hin untersucht. Je nach Verteilung wurden dann parametrische und non-parametrische Testverfahren angewandt. Bei Vorliegen von normalverteilten Daten kam der „t-Test für zwei unverbundene Stichproben“, bei nicht normalverteilten Daten der „Mann-Whitney-U-Test“ zur Anwendung. Die ermittelten statistischen Unterschiede wurde bei einem $p\text{-Wert} < 0,05$ als signifikant betrachtet.

4 Ergebnisse

4.1 Morphologie der Restenose in Stent-tragenden humanen Beinarterien

Die Morphologie der peripheren In-Stent-Restenose wurde an fünf humanen Beinarterien nach Beinamputation bei hochgradiger peripherer arterieller Verschlusskrankheit untersucht (vgl. Kap. 3.2.1).

Anhand von Sägeschliffpräparaten konnten hierbei mehrere Schnittebenen der Stent-tragenden humanen Arterien dargestellt und analysiert werden.

Abb. 4.1 a-d zeigt eine langstreckig atherosklerotisch veränderte Beinarterie. Aufgrund einer Gefäßdissektion wurde hier eine sogenannte Stent-in-Stent-Versorgung vorgenommen, das heißt eine Platzierung eines zweiten in dem ersten Stent. Während die Stent-Struts des ersten Stents vollständig von einer Neointima umgeben sind, die zu einer erneuten Lumeneinengung geführt hat, sind die Stent-Struts des zweiten Stents nur partiell in das narbige Gewebe integriert (Abb. 4.1 a/b). Im Rahmen der Stentversorgung wurde dabei ein kleines abgehendes Gefäß verschlossen (Abb. 4.1 b/c). Weiter distal erfolgte die Platzierung sogenannter „kissing stents“ in einer Bifurkation der Arterie. Auch hier ist deutlich die neu gebildete Neointima im Bereich der Stent-Struts sichtbar (Abb. 4.1 d).

Ein zweites Beispiel einer peripheren Stent-tragenden humanen Arterie zeigt die Abb. 4.1 e/f. Das vorliegende Gefäß repräsentiert eine Stentversorgung nach Stenosierung einer vorbestehenden Bypass-Anastomose. Zu sehen ist die deutliche Lumeneinengung durch eine Restenose innerhalb der Prothese. Auch die Stent-Struts sind zum Teil bereits von einer Neointima umgeben.

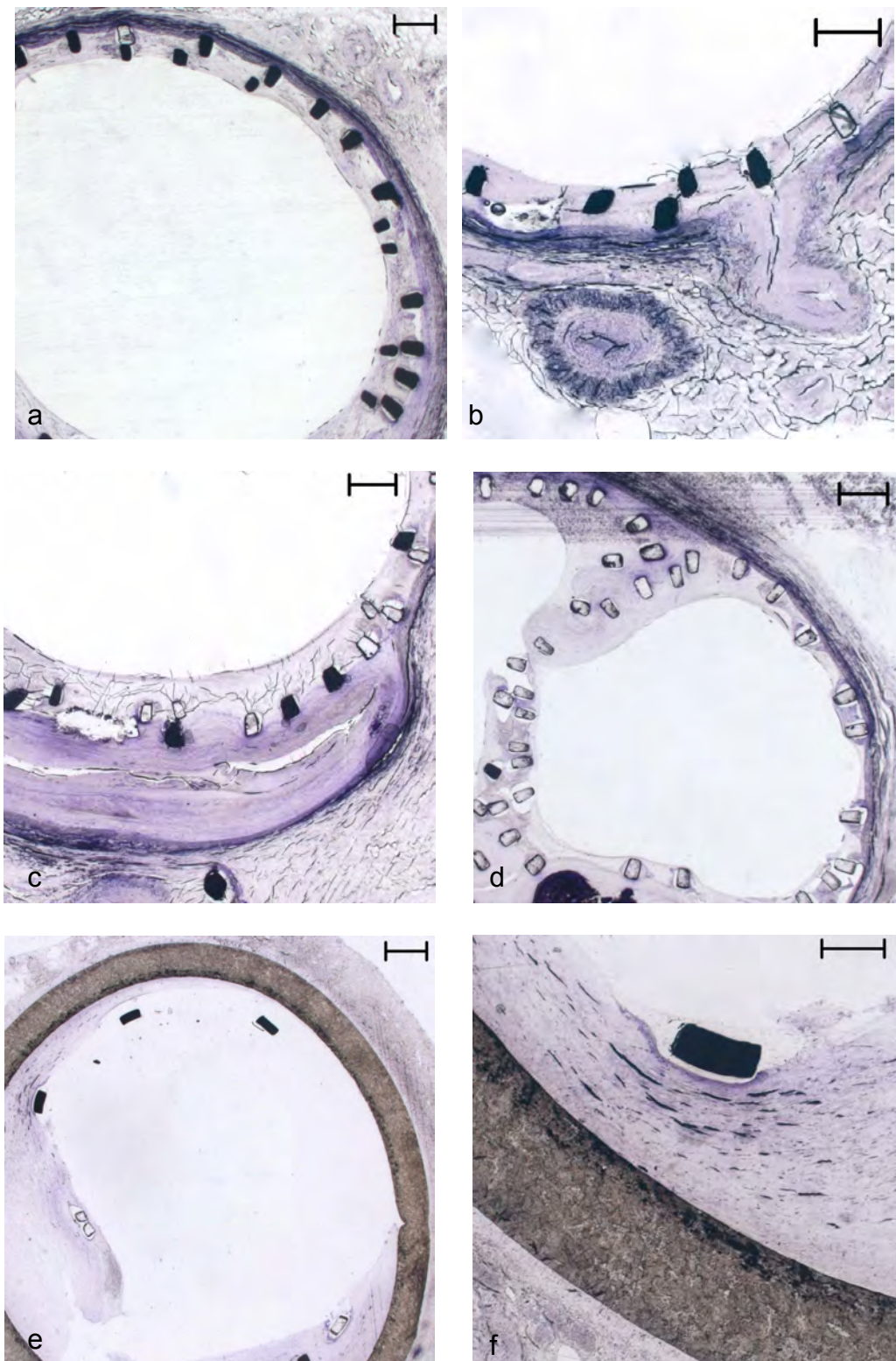
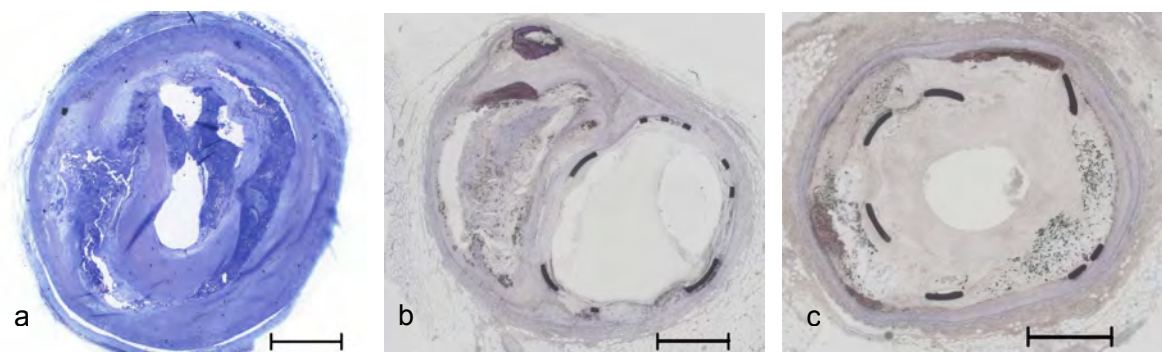
Abb. 4.1: Stent-tragende humane Beinarterien

Abb. 4.1 a-d: Stent-tragende Beinarterie. Das Gefäß wurde überlappend gestentet (a), mit Verschluss eines abgehenden Gefäßes (b) und einer Gefäßdissektion (c); weiter distal Versorgung einer Bifurkation durch „kissing stents“ (d) **Abb. 4.1 e/f:** Beinarterie, mit Stent und Gefäßprothesen-Versorgung (Vergrößerung a-e: 1.25x, Messbalken a,e: 0,6mm; b,c,d: 0,5mm, Vergrößerung f: 4x, Messbalken: 200µm)

4.2 Humane Koronararterien

An einem bereits charakterisierten Kollektiv Stent-tragender humaner Koronararterien (Bräsen et al. 2001) wurde zunächst die PPAR β/δ -Expression nach Stentimplantation beziehungsweise Ballondilatation untersucht. Hierbei zeigte sich eine deutliche Hochregulation der PPAR β/δ -Expression zwei Wochen nach Stentimplantation, während sieben Stunden nach Ballondilatation und zu späteren Zeitpunkten keine Expression nachweisbar war (Abb. 4.2 und 4.3).

Abb. 4.2: Stent-tragende humane Koronararterien



Die **Abb. 4.2 a-c** zeigen Toluidinblau-gefärbte Querschnitte humaner Koronararterien sieben Stunden nach Ballondilatation (**a**), sowie zwei Wochen (**b**) und drei Jahre (**c**) nach Stentimplantation. a: Hartgewebsschnitt nach Methylmethacrylat-Einbettung, b/c: Sägeschliffpräparate nach Methylmetacrylat-Einbettung (Vergrößerung 1.25x, Messbalken: 1mm).

Abb. 4.3: PPAR β/δ -Expression nach Stentimplantation

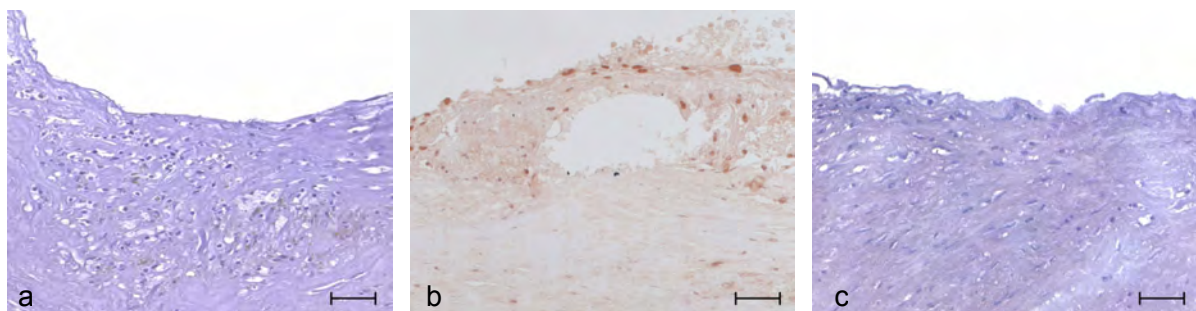


Abb. 4.3 a-c: PPAR β/δ -Färbung an Hartgewebsschnitten nach Methylmethacrylat-Einbettung; sieben Stunden nach Ballondilatation (**a**), sowie zwei Wochen (**b**) und drei Jahre (**c**) nach Stentimplantation. Positiv-gefärbte Zellkerne (braun) finden sich nur in der Restenose einer humanen Koronararterie zwei Wochen nach Stentimplantation (**b**). (Vergrößerung 20x, Messbalken: 60 μ m)

Mittels Mehrfachmarkierungen konnte die PPAR β/δ -Expression in glatten Muskelzellen der Restenose, in Endothel und in Makrophagen nachgewiesen werden (vgl. Abb. 4.4).

Abb. 4.4: PPAR β/δ -Expression durch glatte Muskelzellen, Makrophagen und Endothel

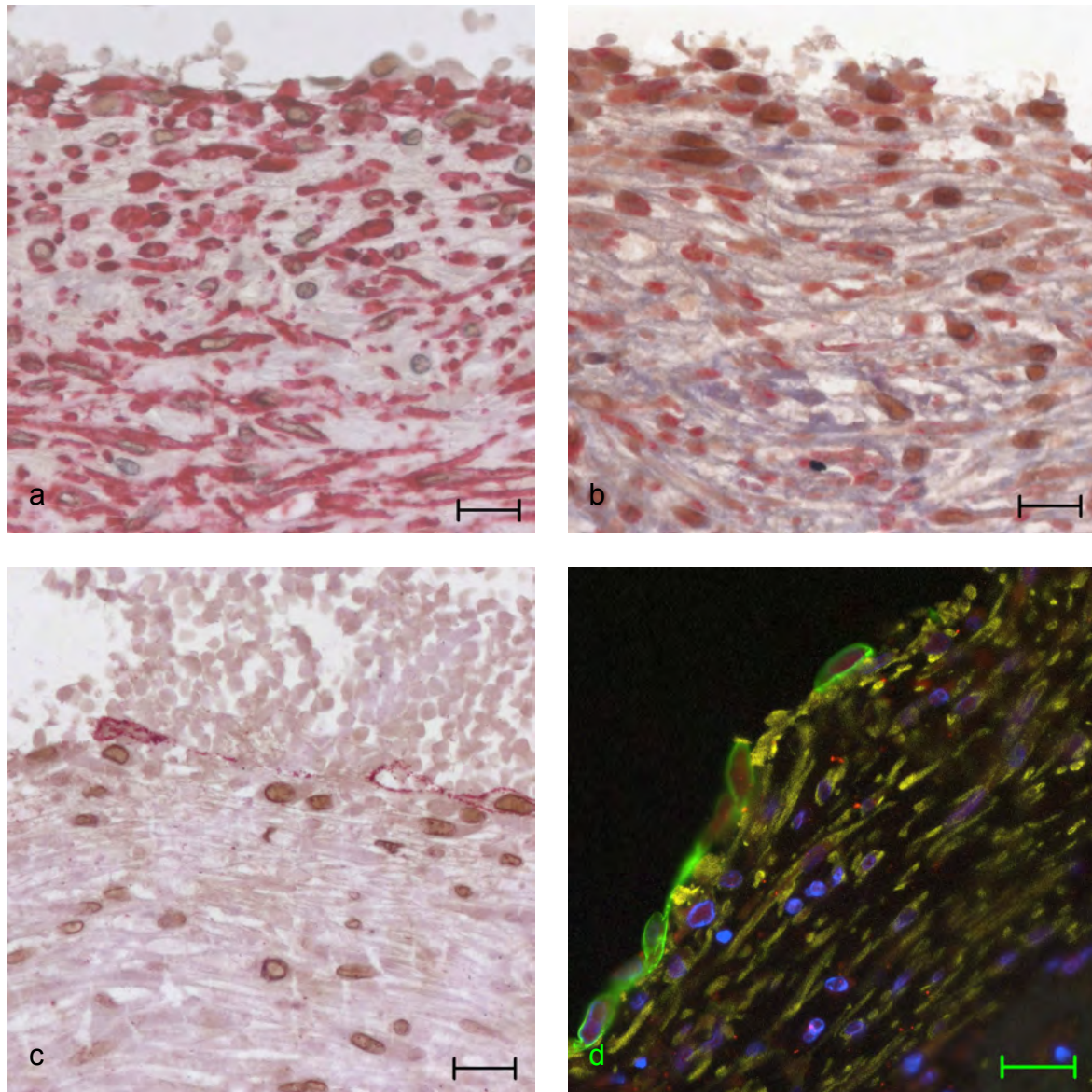


Abb. 4.4 a-d: Immunhistochemische Mehrfachmarkierungen im Hellfeld (**a-c**) und Dunkelfeld (**d**) zum Nachweis der PPAR β/δ -Expression in glatten Muskelzellen (**a**), Makrophagen (**b**) und Endothelzellen(**c**). Die PPAR β/δ -positiven Zellkerne sind braun (Primärer Antikörper: PPAR β), das jeweils positiv-angefärbte Zytoplasma ist rot (Primäre Antikörper: a: Smooth Muscle Actin, b: CD 68, c: CD 34). Im Dunkelfeld zeigt sich die PPAR β/δ -Expression (rot) durch Endothel (grün) und glatte Muskelzellen (gelb). (Vergrößerung 40x, Messbalken: 60 μ m)

4.3 Auswirkung einer PPAR β/δ -Aktivierung auf die experimentelle

Restenose

Am Kaninchen-Tiermodell (vgl. Kap. 3.1) wurde die Auswirkung eines PPAR β/δ -Agonisten auf die Restenose nach Implantation PPAR β/δ -Agonist-beschichteter Stents ermittelt. Die Ergebnisse der morphologischen Untersuchungen wurden dabei für die Tiergruppen, Kontrollgruppe, Low-Dose- und High-Dose-Gruppe, jeweils nach 14 und nach 42 Tagen (vgl. Kap. 3.1) miteinander verglichen (vgl. Tab. 4.1)

Tabelle 4.1: Ergebnisse der morphologischen Untersuchungen am Tiermodell

		14 Tage		42 Tage		
Untersuchter Parameter		Kontrolle	High Dose	Kontrolle	High Dose	Low Dose
Athero- sklerose	Fläche (mm ²)	2,25 ±1,25	2,63 ±1,55	2,09 ±1,66	3,42* ±1,40	2,76 ±2,56
Re-Endo- thelialisie- rung	Fläche (mm ²)	88,31 ±4,07	93,65 ±6,99	92,38 ±13,84	88,07 ±11,78	91,17 ±6,74
Restenose	Fläche (mm ²)	0,66 ±0,21	0,59 ±0,23	0,92 ±0,44	0,65 ±0,26	0,49*** ±0,13
	Proliferation (KiS1) (Kerne)	15,47 ±6,99	9,11* ±4,96	24,70 ±26,71	8,56 ±9,35	5,10 ±4,45
	PPAR β/δ - Expression (Kerne)	186,73 ±169,16	42,81** ±47,08	0 ±0	31,51 ±36,38	0 ±0
Glatte Muskel- zellen (%)	Restenose	5,47 ±2,71	10,18 ±8,51	7,57 ±3,02	13,97 ±7,72	8,21 ±8,15
	Athero- sklerose	4,79 ±5,90	5,70 ±1,07	8,05 ±4,01	4,99 ±2,63	5,13 ±2,18
	Media	6,45 ±2,31	10,34 ±4,88	5,05 ±1,60	9,76 ±5,12	5,22 ±3,37
Makrophagen (%)	Restenose	4,99 ±5,05	3,65 ±3,10	3,55 ±2,92	4,38 ±3,21	5,89 ±5,22
	Athero- sklerose	7,06 ±5,63	8,37 ±10,46	4,19 ±4,13	7,21 ±4,37	4,86 ±4,04
	Media	4,33 ±2,67	3,41 ±0,45	7,01 ±7,55	7,19 ±10,34	7,38 ±3,83

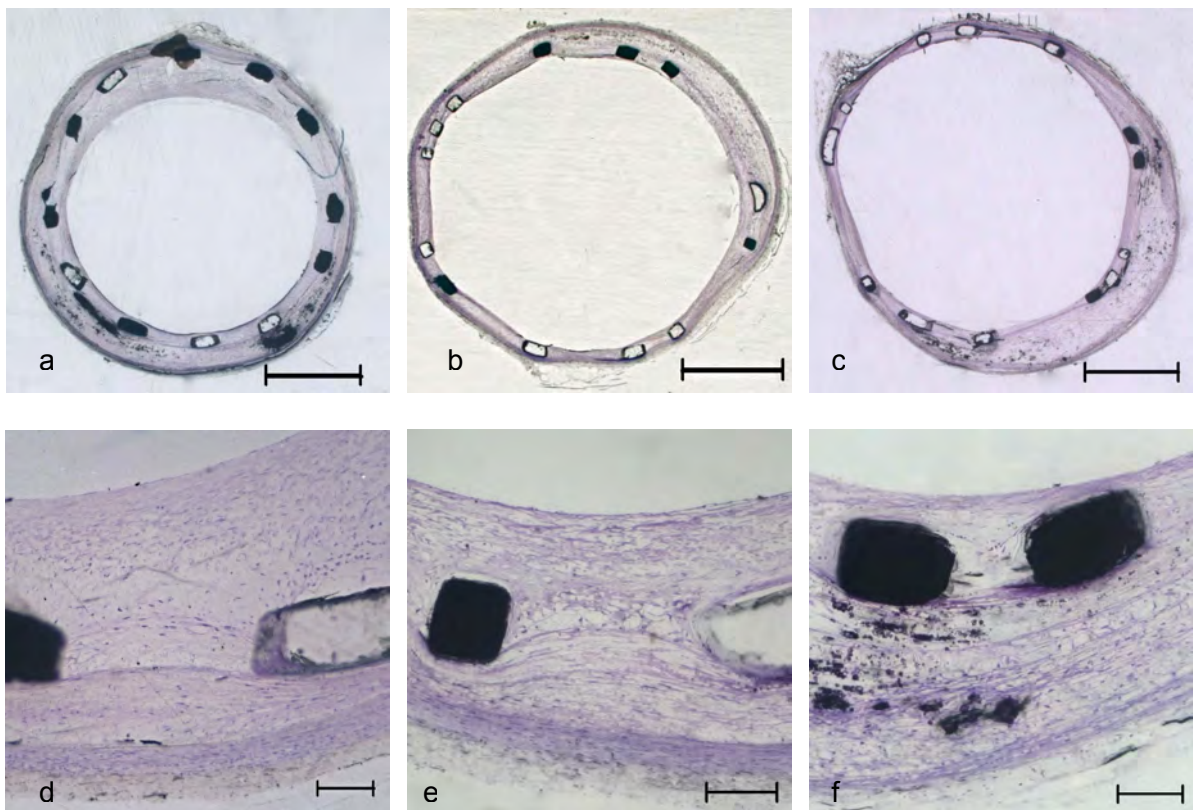
Die **Tab. 4.1** zeigt die Ergebnisse der morphologischen Untersuchungen aufgeschlüsselt nach Tiergruppen und Untersuchungszeitpunkt als Mittelwert ± Standardabweichung.

*p<0,05 vs. Kontrollgruppe; **p<0,01 vs. Kontrollgruppe ***p<0,0001 vs. Kontrollgruppe

4.3.1 Ausmaß der In-Stent-Restenose

Anhand der Toluidinblau-gefärbten Sägeschliffpräparate wurde das Ausmaß der In-Stent-Restenose planimetrisch quantifiziert. Nach 14 Tagen zeigten sich keine Unterschiede hinsichtlich der Restenose zwischen der Kontrollgruppe und der High-Dose-Gruppe (vgl. Tab. 4.1). Nach 42 Tagen zeigte sich eine signifikant geringere Restenosefläche in der Low-Dose-Gruppe ($0,49 \text{ mm}^2 \pm 0,13$) verglichen mit der Kontrollgruppe ($0,92 \text{ mm}^2 \pm 0,44$; $p < 0,0001$). Auch in der High-Dose-Gruppe war die Restenosefläche gegenüber der Kontrollgruppe geringer, wenn auch nicht signifikant ($p = 0,066$) (vgl. Tab. 4.1).

Abb. 4.5: Ausmaß der Restenose nach 42 Tagen



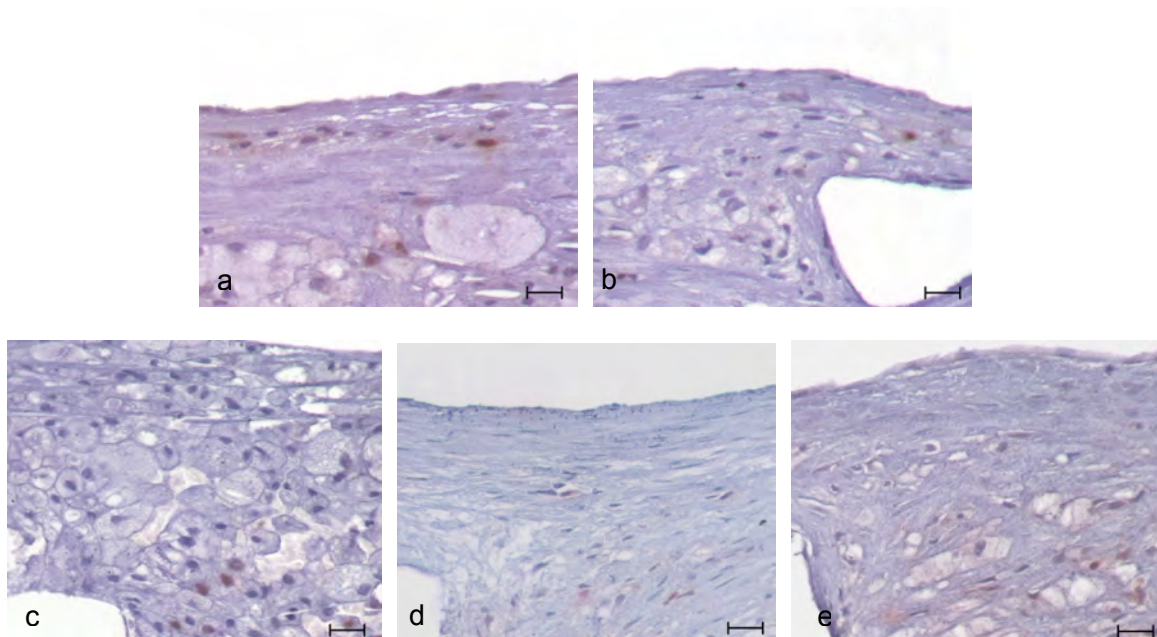
Die **Abb. 4.5 a-f** zeigen das Ausmaß der Restenose 42 Tage nach Stentimplantation in der Kontrollgruppe (**a/d**), High-Dose-Gruppe (**b/e**) und Low-Dose-Gruppe (**c/f**). Es zeigt sich eine deutlich geringere Restenose (Fläche luminal der schwarzen Stent-Struts) sowohl in der High-Dose- als auch in der Low-Dose-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe. (Vergrößerung a-c 1.25x, Messbalken: 1mm) (Vergrößerung d-f 10x, Messbalken: 100µm)

4.3.2 Proliferative Aktivität in der experimentellen Restenose

Zur Erfassung der proliferativen Aktivität in der Restenose in den Kaninchengefäßen diente die KiS1-Färbung, die immunhistochemisch proliferierende Zellkerne markiert. Nach 14 Tagen war die Proliferation in der High-Dose-Gruppe (9,11 Zellkerne \pm 4,96) verglichen mit der Kontrollgruppe (15,47 Zellkerne \pm 6,99) signifikant niedriger ($p < 0,05$) (vgl. Tab. 4.1).

Nach 42 Tagen waren die Unterschiede in der proliferativen Aktivität nicht mehr signifikant, tendenziell zeigte sich aber auch hier eine geringere Proliferation sowohl in der High-Dose-Gruppe als auch in der Low-Dose-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe (vgl. Tab. 4.1).

Abb. 4.6: Proliferative Aktivität in der Restenose



Die **Abb. 4.6** zeigen die proliferative Aktivität in der Restenose nach 14 Tagen (**a/b**) und nach 42 Tagen (**c-e**). Dabei zeigt **Abb. 4.6 a** (Kontrollgruppe) eine höhere Anzahl positiv markierter Zellkerne (braun) als **Abb. 4.6 b** (High-Dose-Gruppe). Auch nach 42 Tagen ist die proliferative Aktivität in der Kontrollgruppe (**c**) gegenüber der High-Dose-Gruppe (**d**) und der Low-Dose-Gruppe (**e**) erhöht. (Vergrößerung 40x, Messbalken: 20 μ m)

4.3.3 Re-Endothelialisierung

Anhand der immunhistochemischen PECAM-Färbung wurde die Re-Endothelialisierung nach Stent-Implantation untersucht. Bereits nach 14 Tagen war praktisch eine komplette Re-Endothelialisierung in allen Gruppen erfolgt, sodass sich

keine Unterschiede hinsichtlich der Endothelialisierung zwischen den Gruppen feststellen ließen (vgl. Tab. 4.1).

Abb. 4.7: Re-Endothelialisierung nach 14 und 42 Tagen

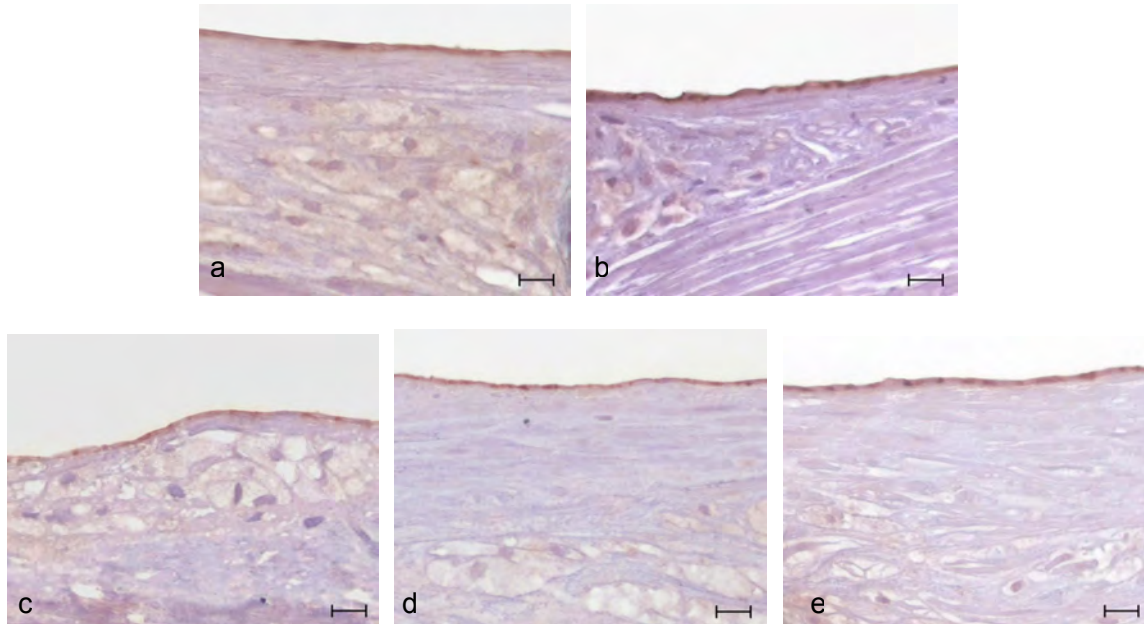


Abb. 4.7: Re-Endothelialisierung 14 und 42 Tage nach Stentimplantation. Zu erkennen ist ein durchgehendes immunhistochemisch braun markiertes Endothel 14 Tage nach Stentimplantation sowohl in der Kontrollgruppe (**a**) als auch in der High-Dose-Gruppe (**b**). Die komplette Re-Endothelialisierung ist nach 42 Tagen (**c-e**) ebenfalls anhand des positiv markierten Endothels in der Kontrollgruppe (**c**), der High-Dose-Gruppe (**d**) und der Low-Dose-Gruppe (**e**) zu erkennen. (Vergrößerung 40x, Messbalken: 20µm)

4.3.4 PPAR β/δ -Expression

Die immunhistochemische PPAR β/δ -Färbung zeigte eine signifikant niedrigere PPAR β/δ -Expression in der High-Dose-Gruppe (42,81 Zellkerne \pm 47,08) gegenüber der Kontrollgruppe (186,73 Zellkerne \pm 169,16) nach 14 Tagen ($p < 0,01$). Nach 42 Tagen waren keine Unterschiede hinsichtlich der Expression mehr feststellbar (vgl. Tab. 4.1).

Anhand von immunhistochemischen Mehrfachmarkierungen konnte die PPAR β/δ -Expression sowohl in glatten Muskelzellen als auch in Makrophagen lokalisiert werden (vgl. Abb. 4.8).

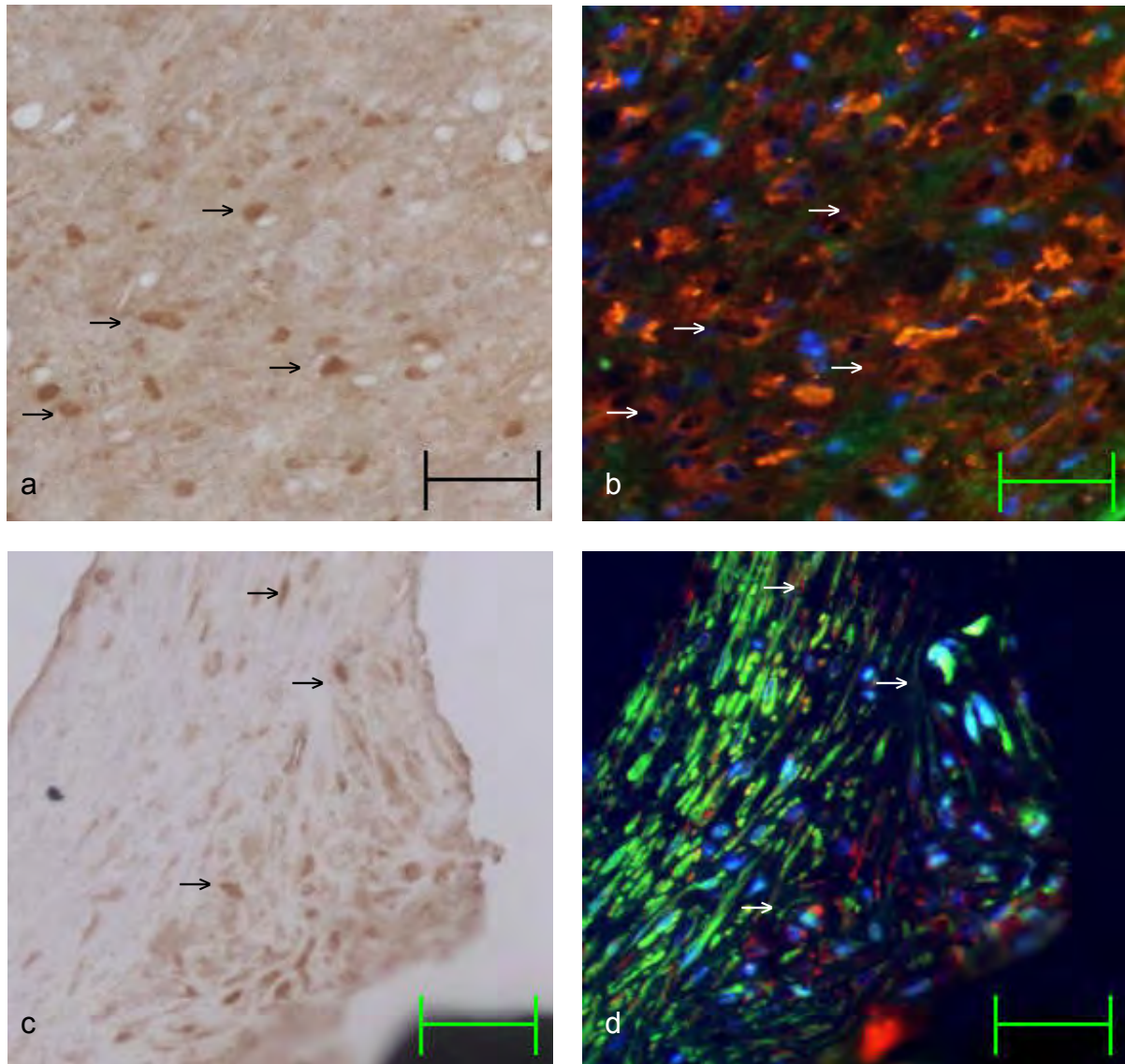
Abb. 4.8: PPAR β/δ -Expression in der Restenose

Abb. 4.8 a-d: Mehrfachmarkierungen im Hell- und Dunkelfeld an jeweils identischen Schnittpräparaten (**a/b** und **c/d**): PPAR β/δ -Expression in der Restenose durch Makrophagen und glatte Muskelzellen. **a/c**: PPAR β/δ -positive Zellkerne braun angefärbt (Primärer Antikörper: PPAR β); **b/d**: Makrophagen mit Rotfluoreszenz markiert (Primärer Antikörper: RAM 11), glatte Muskelzellen mit Grünfluoreszenz markiert (Primärer Antikörper: Smooth Muscle Actin); Pfeile: Kolokalisation. (Vergrößerung a/b: 20x; c/d:40x, Messbalken a/b: 10 μ m; c/d: 20 μ m)

4.4 Humane Atherektomien

Es wurden insgesamt 151 Atherektomie-Proben von 124 Patienten untersucht, die zwischen 2007 und 2009 im Herzzentrum Bad Krozingen aufgrund einer peripheren arteriellen Verschlusskrankheit der Beinarterien atherektomiert wurden (vgl. Kap. 3.2.2).

Aus dem Gesamtkollektiv von 151 Proben wurden drei Kollektive gebildet (vgl. Kapitel 4.3.1) und innerhalb dieser Kollektive die Ergebnisse der morphologischen Untersuchung mit klinischen Daten korreliert.

4.4.1 Kollektivbildung

Zur Bildung von Kollektiven wurde die Interventionshäufigkeit als Hauptkriterium genutzt. Das heißt, die Patienten wurden je nachdem, ob sie im Zeitraum zwischen 2007 und 2009 einmal oder mehrmals atherektomiert und damit einmal oder mehrmals im Gesamtkollektiv erfasst wurden, in verschiedene Gruppen eingeteilt.

Das größte Kollektiv bildete dabei die Gruppe von Patienten, die im erfassten Zeitraum nur einem Eingriff unterzogen wurden und dementsprechend im Gesamtkollektiv aller Proben nur einmal erfasst wurden. Dieses Kollektiv wird im Folgenden als Kollektiv 1 bezeichnet (vgl. Tab. 4.2).

Tabelle 4.2: Kollektiv 1

	Alle	Denovo	In-Stent- Restenose	In-Stent-Re- Restenose	Post- Interventions- Restenose
Anzahl Proben	82	36	5	7	8
Anzahl Patienten	82	36	5	7	8
Alter (Jahre)	70,7 ± 9,6	68,9 ± 10,4	73,0 ± 7,7	72,9 ± 9,7	64,9 ± 11,5
Frauen	37	15	2	3	5
Männer	45	20	3	4	3

Die **Tab. 4.2** zeigt das Patientenkollektiv 1, aufgeschlüsselt nach dem Läsionstyp. Nicht einzeln aufgeführt sind 26 Proben mit unbekanntem oder gemischtem Läsionstyp. (Alter: Mittelwert ± Standardabweichung)

Demgegenüber steht das Kollektiv 2, eine Gruppe von Patienten, die zwischen 2007 und 2009 zunächst an einer Denovo-Läsion und später an gleicher Stelle an einer In-

Stent-Restenose oder an einer Post-Interventions-Stenose operiert wurden (vgl. Tab. 4.3).

Das Kollektiv 3 umfasst alle übrigen Proben, das heißt Proben von Patienten, die im erfassten Zeitraum mehrfach atherektomiert wurden, jedoch anders als Patienten in Kollektiv 2 nicht als direkter Follow-up-Eingriff einer Denovo-Läsion. Es handelt sich überwiegend um Proben aus Läsionen unterschiedlicher Lokalisation (vgl. Tab. 4.4).

Tab. 4.3: Kollektiv 2

	Alle	Denovo	In-Stent-Restenose	Post-Interventions-Restenose
Anzahl Proben	14	7	1	6
Anzahl Patienten	7	7	1	6
Alter (Jahre)	70,6 ±5,5	71,1 ±5,0	69,0 ±0,0	70,2 ±7,0
Frauen*	6	3	0	3
Männer*	8	4	1	3

Die **Tab. 4.3** zeigt das Patientenkollektiv 2, aufgeschlüsselt nach der Läsionsart. (Alter: Mittelwert ± Standardabweichung). *Angabe ist jeweils die Anzahl der Proben von männlichen und weiblichen Patienten

Tabelle 4.4: Kollektiv 3

	Alle	Denovo	In-Stent-Restenose	Post-Interventions-Restenose
Anzahl Proben	56	13	29	9
Anzahl Patienten	35			
Alter (Jahre)	66,8 ±8,5	67,1 ±7,8	66,2 ±8,8	65,2 ±10,3
Frauen*	30	4	16	5
Männer*	26	9	13	4

Die **Tab. 4.4** zeigt das Patientenkollektiv 3, aufgeschlüsselt nach Läsionstyp. Nicht einzeln aufgeführt sind 5 Proben mit unbekanntem oder gemischtem Läsionstyp. (Alter: Mittelwert ± Standardabweichung). *Angabe ist jeweils die Anzahl der Proben von männlichen und weiblichen Patienten

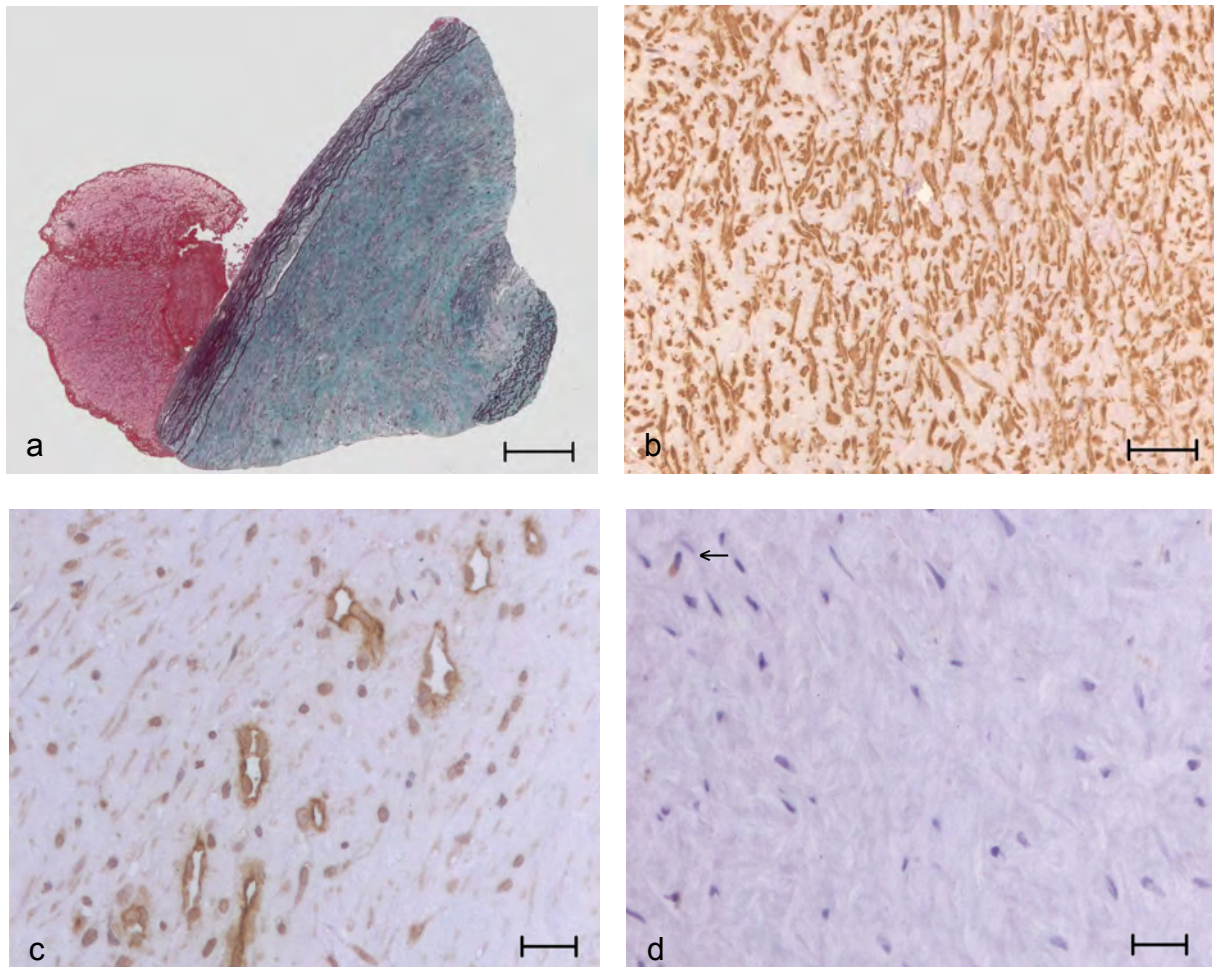
4.4.2 Morphologische Analysen

4.4.2.1 Zusammensetzung des Gewebes

Die Zusammensetzung des humanen Atherektomie-Gewebes wurde zum einen mittels der Färbung nach Masson-Goldner, Elastika-van Gieson und von Kossa analysiert. Hierbei konnten die Flächenanteile von Bindegewebe, elastischen Fasern, Fibrin und Kalk am selben Schnittpräparat ermittelt werden. Zum anderen wurden mit-

tels immunhistochemischer Markierung glatte Muskelzellen, Kapillar- und Oberflächenendothel sowie Makrophagen gezeigt. Die Abb. 4.9 zeigt repräsentativ die Zusammensetzung des Atherektomie-Gewebes, das insgesamt einen weitestgehend homogenen Charakter zeigte. Es bestanden keine wegweisenden Unterschiede hinsichtlich der Gewebezusammensetzung zwischen den einzelnen Läsionstypen. Die immunhistochemische Färbung auf Makrophagen zeigt hierbei insgesamt einen sehr geringen Anteil an Makrophagen im untersuchten Gewebe (vgl. Abb. 4.9 d).

Abb. 4.9: Zusammensetzung der humanen Atherektomien



Die **Abb. 4.9 a** zeigt Gewebe aus humanen Atherektomien, das mit der kombinierten histochemischen Färbung nach Masson-Goldner, Elastika-van Gieson und von Kossa gefärbt wurde. Es zeigen sich Bindegewebe (grün), elastische Fasern (lila) und thrombotisches Material (pink). **Abb. 4.9 b-c** zeigen die immunhistochemische Anfärbung (braun) von glatten Muskelzellen (**b**), Kapillarendothel (**c**) und Makrophagen (Pfeil (**d**)). (Vergrößerung a: 4x, b: 20x, c/d: 40x, Messbalken a: 0,8 mm, b: 60µm, c/d: 20µm)

Trotz der insgesamt weitestgehend homogenen Zusammensetzung des untersuchten Gewebes konnten in Kollektiv 1 tendenzielle Unterschiede hinsichtlich der Flächen-

anteile von thrombotischem Material, elastischen Fasern und Bindegewebe in Abhängigkeit von kardiovaskulären Risikofaktoren sowie Läsionstyp und -lokalisation festgestellt werden. Das Untersuchungsmaterial aus iliakalen Arterien wies einen höheren Anteil Fibrin (MW=5% \pm 7) gegenüber Material aus dem femoro-poplitealen Stromgebiet (MW=1% \pm 1; $p=0,058$), sowie einen höheren bindegewebigen Anteil (MW=81% \pm 3) gegenüber cruralen Läsionen auf (MW=72% \pm 4; $p=0,066$). Einen signifikant höheren Anteil elastischer Fasern zeigte das Gewebe von adipösen Patienten (MW=44% \pm 10) gegenüber normalgewichtigen Patienten (MW=33% \pm 10; $p<0,05$). Darüber hinaus konnte ein höherer Fibrinanteil in Gewebe von Patienten, die erhöhte Leukozytenzahlen aufwiesen, gemessen werden (MW=5% \pm 7 gegenüber MW=2% \pm 1; $p=0,06$).

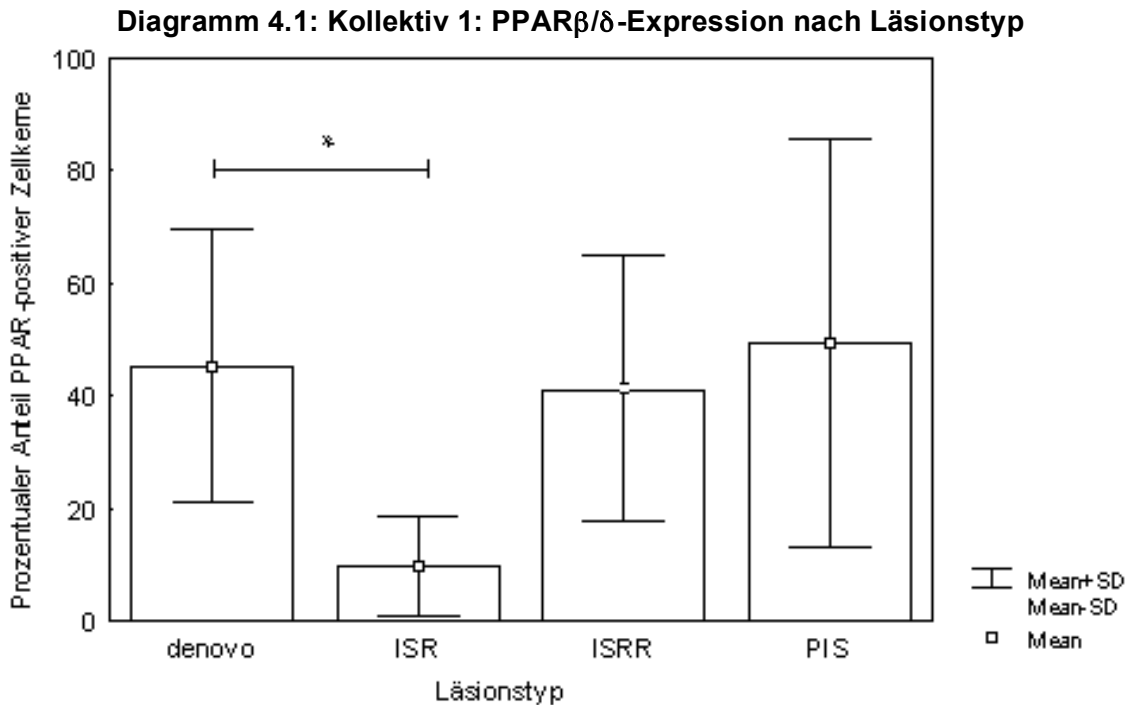
Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Gewebezusammensetzung in den Kollektiven 2 und 3.

4.4.2.2 PPAR β/δ -Expression

Zur Ermittlung der Expression von PPAR β/δ wurden immunhistochemisch positiv gefärbte Zellkerne gezählt und als prozentualer Anteil an der Gesamtkernzahl des Gewebes ausgedrückt.

Hierbei zeigten sich in allen drei Kollektiven deutliche Unterschiede in der PPAR β/δ -Expression hinsichtlich des Läsionstyps, der Läsionslokalisation und hinsichtlich kardiovaskulärer Risikofaktoren wie dem Patientenalter, hohen Entzündungsparametern und Begleiterkrankungen (vgl. Diagramme 4.1, 4.2). Anders als in den humanen Koronararterien (vgl. 4.2) konnte in den humanen Atherektomien keine Abhängigkeit der PPAR β/δ -Expression vom Zeitintervall nach dem letzten interventionellen Eingriff nachgewiesen werden.

In Kollektiv 1 war die PPAR β/δ -Expression in Denovo-Läsionen (MW=45% \pm 24) signifikant höher als in In-Stent-Restenose-Läsionen (MW=10% \pm 9; $p<0,05$). Eine tendenziell aber nicht signifikant höhere PPAR β/δ -Expression zeigten auch die In-Stent-Re-Restenose-Läsionen (MW=41% \pm 24) sowie die Post-Interventions-Restenose-Läsionen (MW=49% \pm 36) gegenüber den In-Stent-Restenose-Läsionen (vgl. Diagramm 4.1, Abb. 4.10).

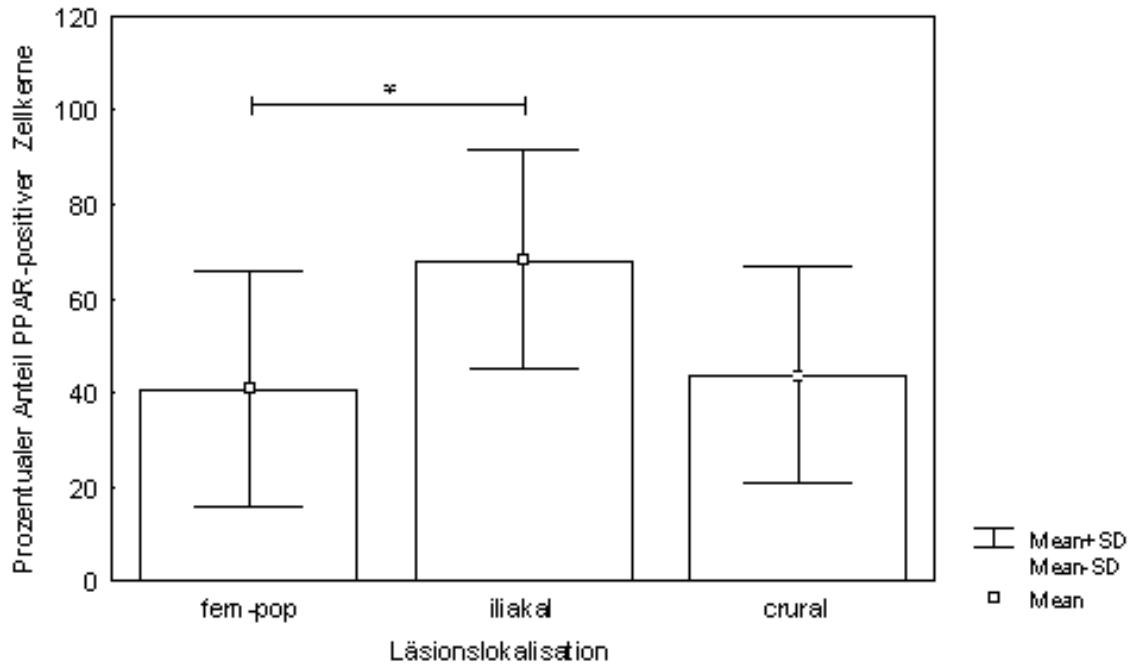
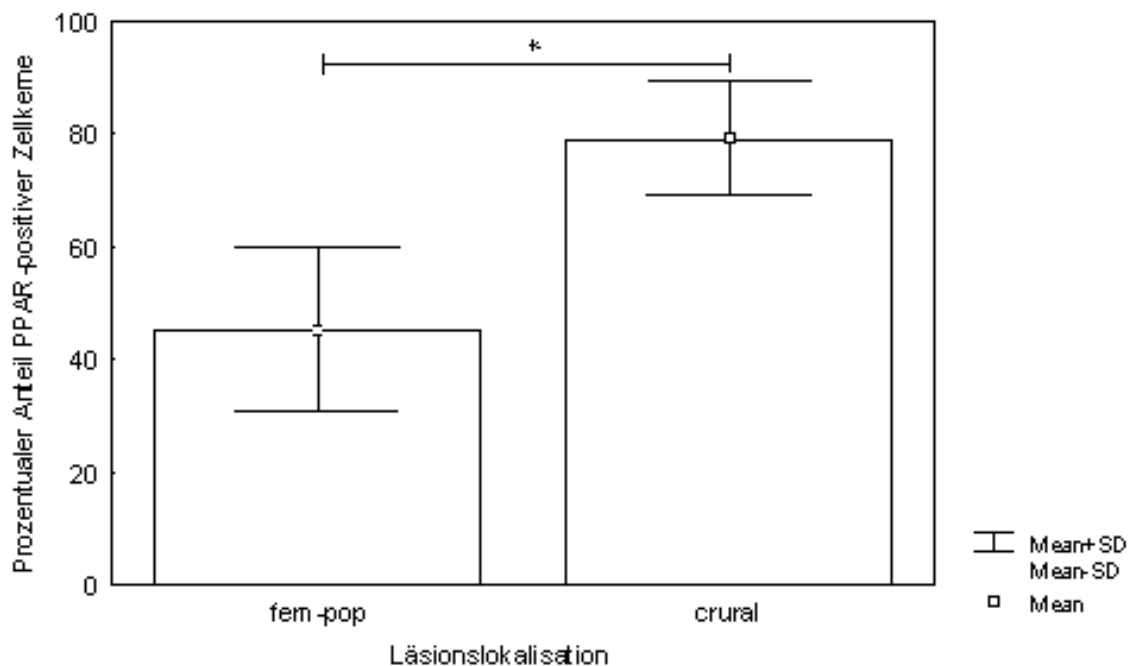


Das **Diagramm 4.1** zeigt die unterschiedliche PPAR β/δ -Expression je nach Läsionstyp (ISR: In-Stent-Restenose, ISRR: In-Stent-Re-Restenose, PIS: Post-Interventions-Restenose). Es zeigt sich eine signifikant geringere PPAR β/δ -Expression in der In-Stent-Restenose-Gruppe als in der Denovo-Gruppe (* $p < 0,05$).

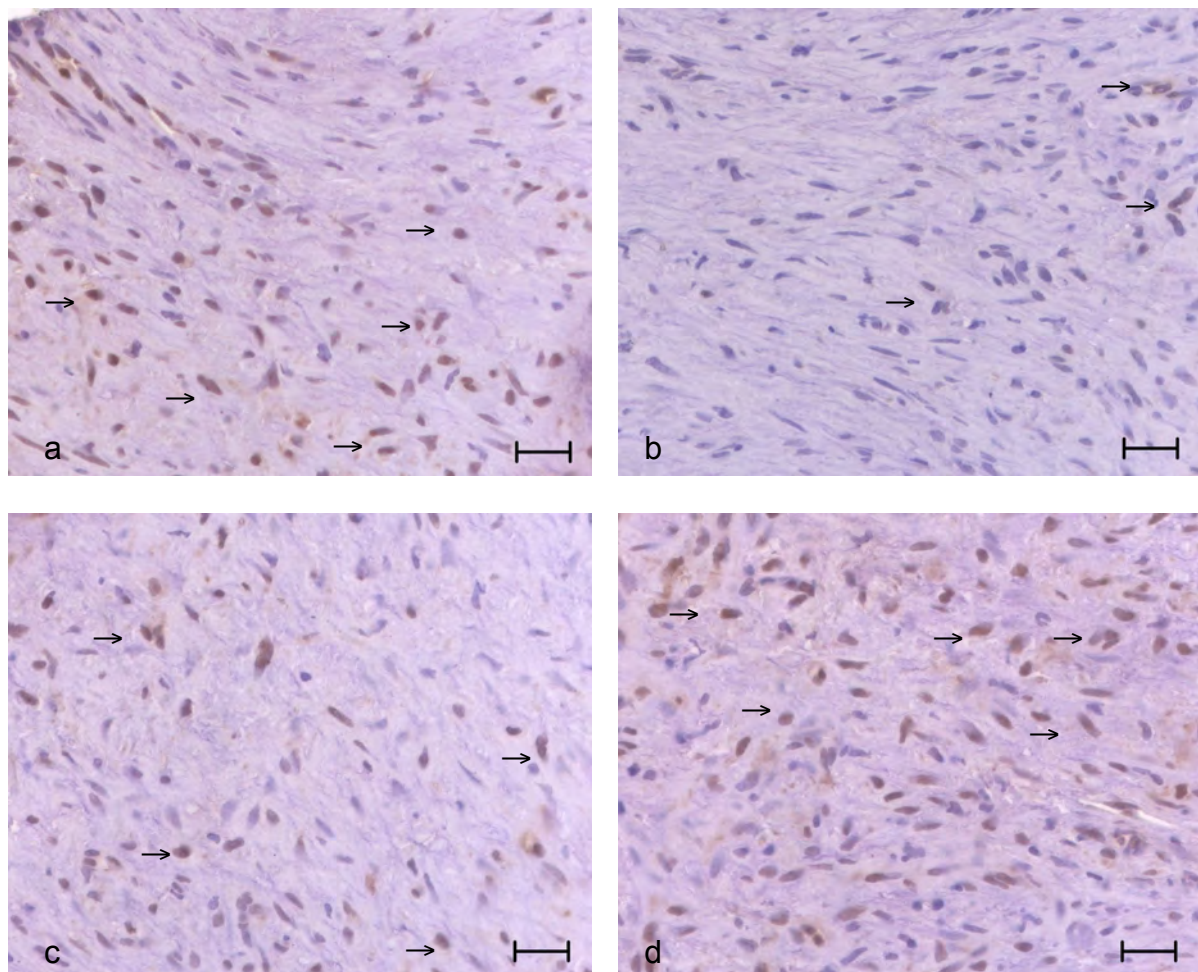
Bei der Läsionslokalisation wurde unterschieden zwischen Patientengruppen mit ausschließlich Läsionen im femoro-poplitealen Stromgebiet (im Folgenden als „femoro-popliteales Stromgebiet“ bezeichnet), Patientengruppen mit Läsionen im femoro-poplitealen und iliakalen Stromgebiet (im Folgenden als „iliakales Stromgebiet“ bezeichnet) sowie Patientengruppen mit Läsionen im femoro-poplitealen und cruralen Stromgebiet (im Folgenden als „crurales Stromgebiet“ bezeichnet).

In Kollektiv 1 zeigte sich eine signifikant höhere PPAR β/δ -Expression bei Patienten mit Läsionen im iliakalen Stromgebiet (MW=68% \pm 23) gegenüber Patienten mit ausschließlich femoro-poplitealen (MW=42% \pm 25; $p < 0,05$) Läsionen (vgl. Diagramm 4.2 a, Abb. 4.11) sowie tendenziell gegenüber Patienten mit cruralen Läsionen (MW=44% \pm 23; $p = 0,07$).

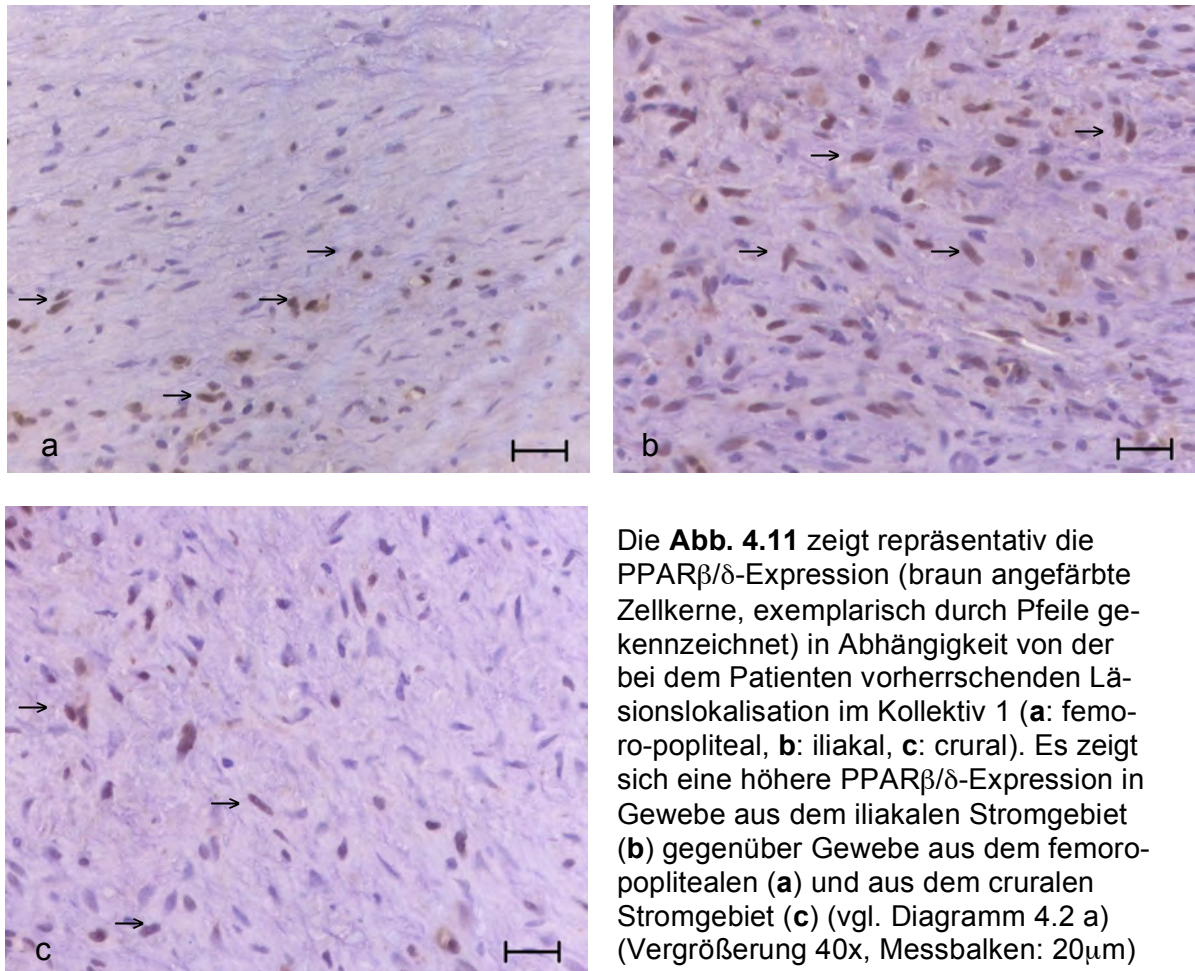
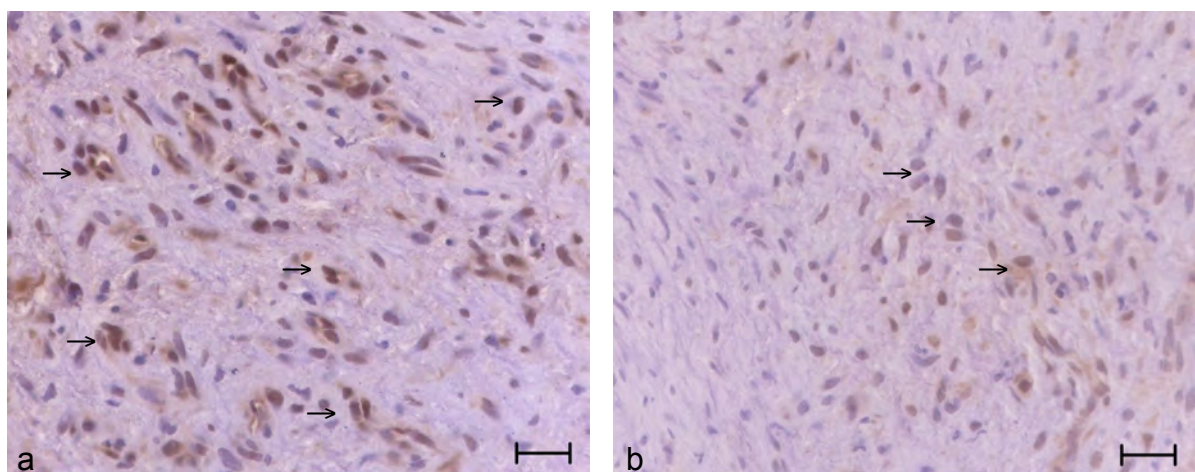
Dagegen zeigte sich in Kollektiv 2 eine signifikant höhere PPAR β/δ -Expression bei Patienten mit cruralen Läsionen gegenüber Patienten mit ausschließlich femoro-poplitealen Läsionen (vgl. Diagramm 4.2 b, Abb. 4.12).

Diagramm 4.2 a: PPAR β/δ -Expression nach Lokalisation in Kollektiv 1**Diagramm 4.2 b: PPAR β/δ -Expression nach Lokalisation in Kollektiv 2**

Das **Diagramm 4.2** zeigt die PPAR β/δ -Expression in Abhängigkeit von der beim Patienten vorherrschenden Läsionslokalisierung in den Kollektiven 1 (**4.2 a**) und 2 (**4.2 b**). Auf der x-Achse sind die vorwiegend betroffenen Stromgebiete aufgetragen (fem-pop: femoro-popliteales Stromgebiet, crural: Stromgebiet des Unterschenkels). In Kollektiv 1 zeigt sich eine stärkere PPAR β/δ -Expression bei Patienten mit Läsionen im iliakalen Stromgebiet (* $p < 0,05$) gegenüber Patienten mit ausschließlich femoro-poplitealen Läsionen. In Kollektiv 2 zeigt sich eine stärkere PPAR β/δ -Expression bei Patienten mit Läsionen im cruralen Stromgebiet (* $p < 0,01$) gegenüber Patienten mit ausschließlich femoro-poplitealen Läsionen.

Abb. 4.10: PPAR β/δ -Expression nach Läsionstyp

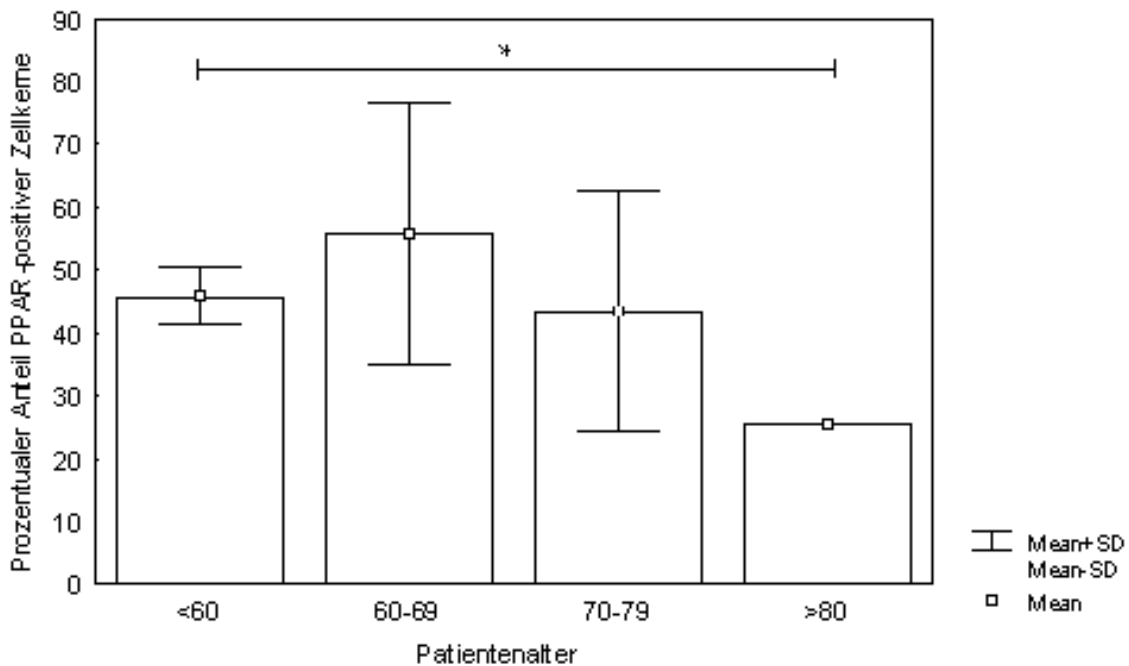
Die **Abb. 4.10** zeigt repräsentativ die PPAR β/δ -Expression (braun angefärbte Zellkerne, exemplarisch durch Pfeile gekennzeichnet) nach Läsionstyp (**a**: Denovo, **b**: In-Stent-Restenose, **c**: In-Stent-Re-Restenose, **d**: Post-Interventions-Restenose). Es zeigt sich eine deutlich geringere PPAR β/δ -Expression in Gewebe aus In-Stent-Restenose-Läsionen (**b**) (vgl. Diagramm 4.1) (Vergrößerung 40x, Messbalken: 20 μ m)

Abb. 4.11: PPAR β/δ -Expression nach Läsionslokalisierung in Kollektiv 1**Abb. 4.12: PPAR β/δ -Expression nach Lokalisation in Kollektiv 2**

Die **Abb. 4.12** zeigt repräsentativ die PPAR β/δ -Expression (braun angefärbte Zellkerne, exemplarisch durch Pfeile gekennzeichnet) in Abhängigkeit von der Lokalisation im Kollektiv 2 (**a**: crural, **b**: femoro-popliteal). Es zeigt sich eine signifikant höhere PPAR β/δ -Expression im Gewebe aus dem curalen Stromgebiet gegenüber Gewebe aus dem femoro-poplitealen Stromgebiet) (vgl. Diagramm 4.2 b). (Vergrößerung 40x, Messbalken: 20 μ m)

In Kollektiv 3 zeigte sich darüber hinaus eine altersabhängige PPAR β/δ -Expression. Verglichen mit über 80-jährigen Patienten wiesen unter 80-jährige eine höhere Expression von PPAR β/δ auf. Dieser Unterschied war nur bei unter 60-jährigen Patienten signifikant (MW=46% \pm 4 gegenüber 26% \pm 0,0; $p < 0,05$) (vgl. Diagramm 4.4).

Diagramm 4.4: Kollektiv 3: PPAR β/δ -Expression nach Patientenalter



Das **Diagramm 4.4** zeigt die PPAR β/δ -Expression in Abhängigkeit vom Alter in Kollektiv 3. Jüngere Patienten (<60 Jahren) zeigen eine signifikant höhere PPAR β/δ -Expression als Patienten über 80 Jahren (* $p < 0,05$).

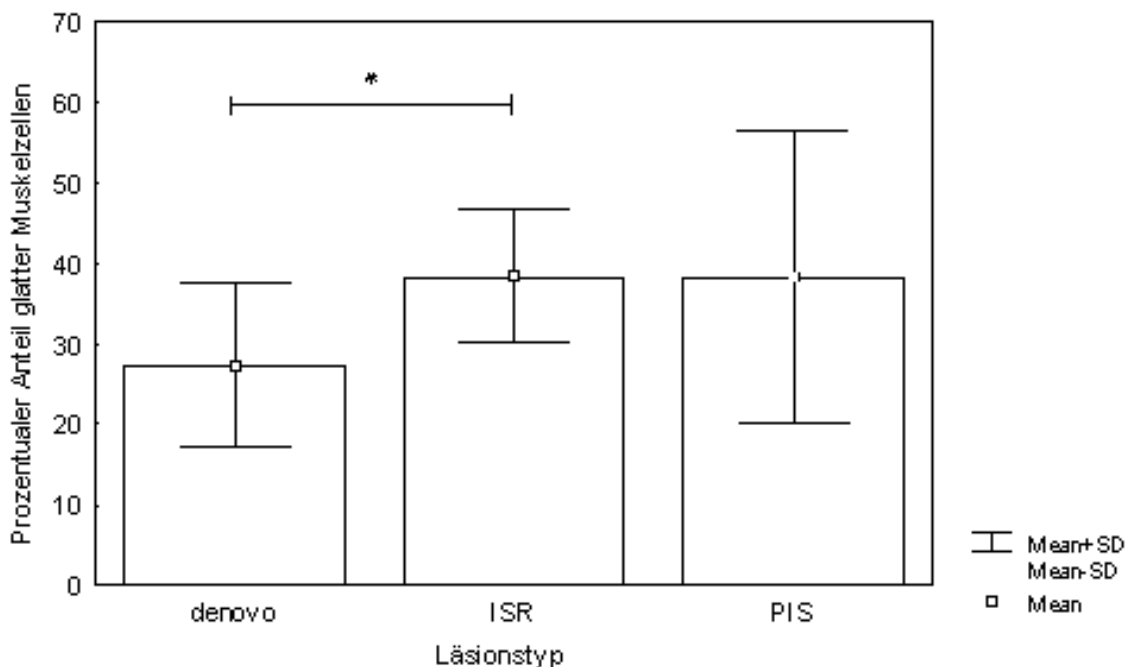
Zudem wies das untersuchte Material Unterschiede in der PPAR β/δ -Expression in Abhängigkeit von bestimmten kardiovaskulären Risikofaktoren auf. Patienten in Kollektiv 3 mit einem nicht-insulinpflichtigen Diabetes mellitus Typ II (NIDDM) wiesen tendenziell eine höhere PPAR β/δ -Expression als Patienten ohne NIDDM auf (MW=62% \pm 24 gegenüber MW=47% \pm 18; $p = 0,095$). Umgekehrt zeigten aber Patienten mit einem insulinpflichtigen Diabetes mellitus (IDDM) eine niedrigere PPAR β/δ -Expression als Patienten ohne IDDM (MW=40% \pm 20 gegenüber MW=53% \pm 18; $p = 0,092$). Darüber hinaus korrelierten hohe CRP-Spiegel im Serum mit einer erniedrigten PPAR β/δ -Expression (MW=41% \pm 16 gegenüber MW=55% \pm 20, Korrelationskoeffizient $-0,37$).

4.4.2.3 Glatte Muskelzellen

Bei der Ermittlung des Anteils glatter Muskelzellen in den Atherektomie-Proben zeigten sich ähnlich wie bei der Auswertung der PPAR β/δ -Expression Unterschiede hinsichtlich des Läsionstyps und der Läsionslokalisation.

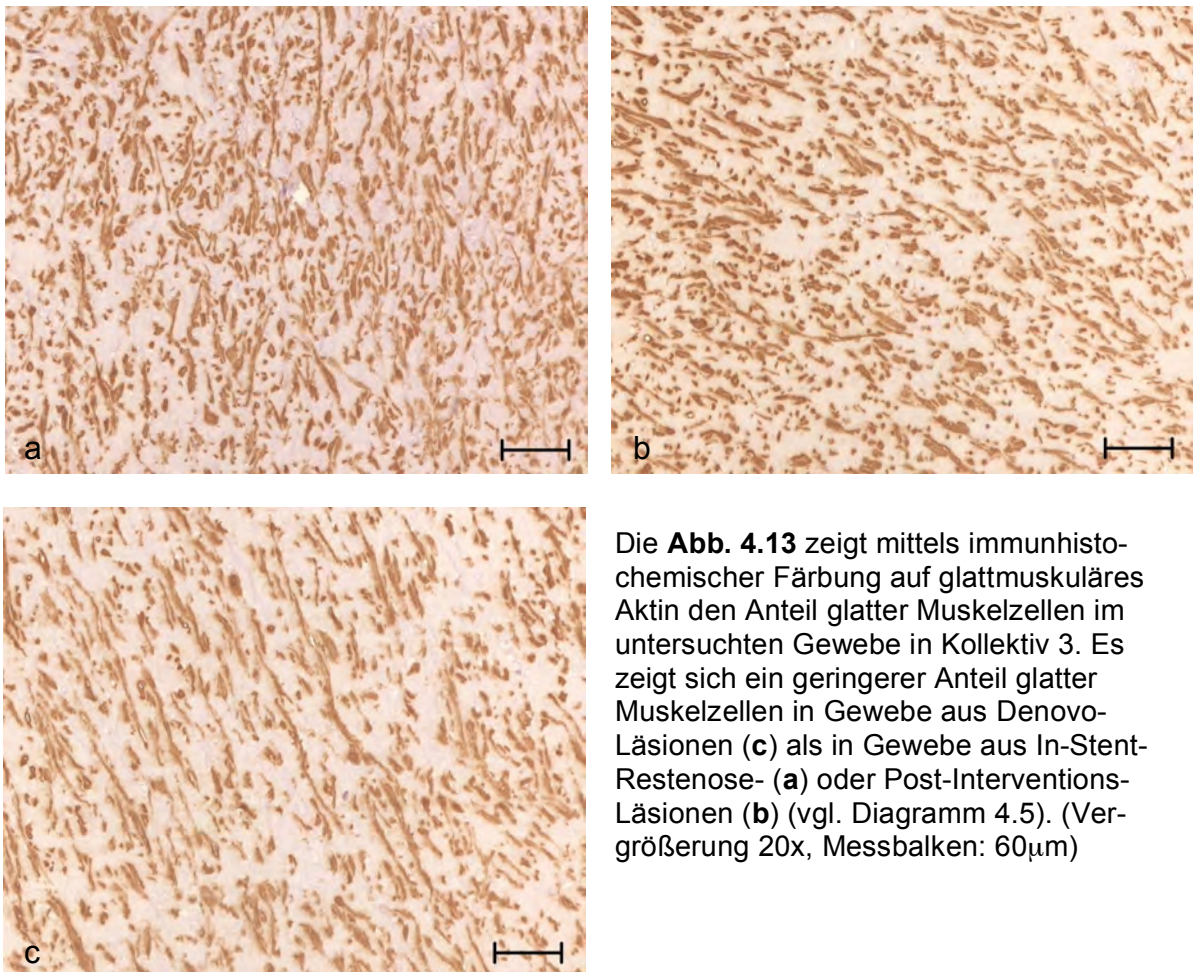
In Kollektiv 2 zeigte sich hierbei ein tendenziell höherer Anteil glatter Muskelzellen in Post-Interventions-Läsionen ($29\% \pm 10$) als in Denovo-Läsionen (MW= $21\% \pm 7$; $p=0,089$). In Kollektiv 3 zeigte sich zusätzlich ein signifikant höherer Anteil glatter Muskelzellen in In-Stent-Restenose-Läsionen (MW= $38\% \pm 8$) gegenüber Denovo-Läsionen (MW= $27\% \pm 10$; $p<0,001$) (vgl. Diagramm 4.5).

Diagramm 4.5: Anteil glatter Muskelzellen nach Läsionstyp in Kollektiv 3



Das **Diagramm 4.5** zeigt den prozentualen Anteil glatter Muskelzellen am Atherektomiegewebe in Abhängigkeit vom Läsionstyp in Kollektiv 3 (ISR: In-Stent-Restenose, PIS: Post-Interventions-Restenose). Es zeigt sich ein höherer Anteil glatter Muskelzellen in In-Stent-Restenose-Läsionen gegenüber Denovo-Läsionen (* $p<0,001$).

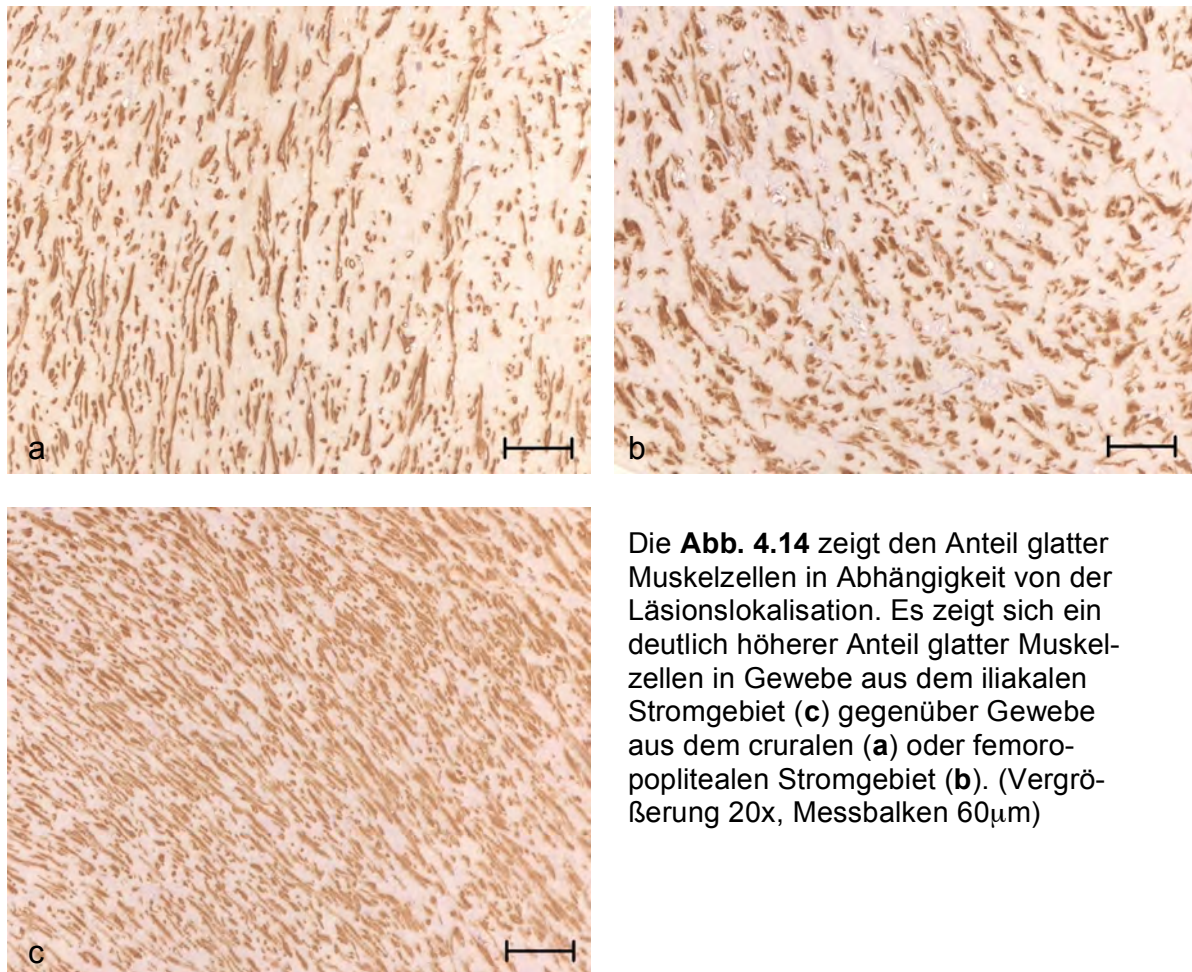
Abb. 4.13: Anteil glatter Muskelzellen nach Läsionstyp in Kollektiv 3



Die **Abb. 4.13** zeigt mittels immunhistochemischer Färbung auf glattmuskuläres Aktin den Anteil glatter Muskelzellen im untersuchten Gewebe in Kollektiv 3. Es zeigt sich ein geringerer Anteil glatter Muskelzellen in Gewebe aus Denovo-Läsionen (**c**) als in Gewebe aus In-Stent-Restenose- (**a**) oder Post-Interventions-Läsionen (**b**) (vgl. Diagramm 4.5). (Vergrößerung 20x, Messbalken: 60µm)

Auch bei der Läsionslokalisation waren Unterschiede hinsichtlich des Anteils glatter Muskelzellen nachweisbar. In Kollektiv 1 war ein höherer Anteil glatter Muskelzellen in der Patientengruppe mit iliakalen Läsionen ($MW=45\% \pm 16$) gegenüber Patienten mit ausschließlich femoro-poplitealen ($MW=28\% \pm 14$; $p<0,05$) oder Patienten mit cruralen Läsionen ($MW= 28\% \pm 12$; $p<0,05$) festzustellen (vgl. Abb. 4.14).

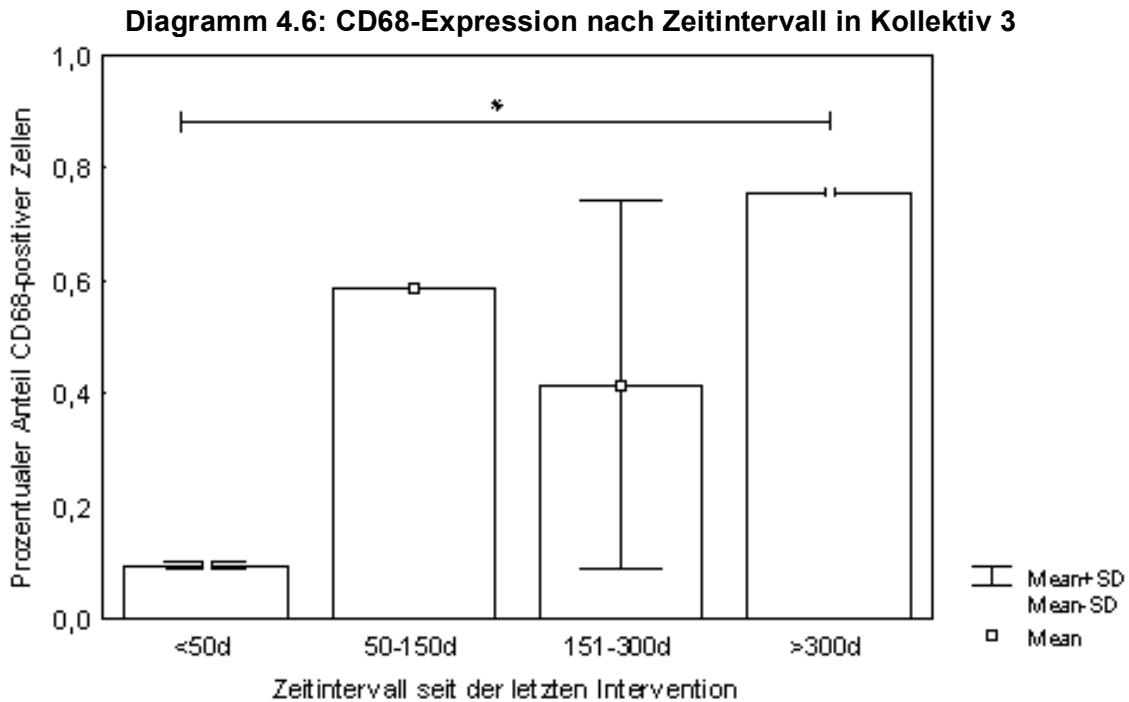
Abb. 4.14: Anteil glatter Muskelzellen nach Läsionslokalisation in Kollektiv 1



Die **Abb. 4.14** zeigt den Anteil glatter Muskelzellen in Abhängigkeit von der Läsionslokalisation. Es zeigt sich ein deutlich höherer Anteil glatter Muskelzellen in Gewebe aus dem iliakalen Stromgebiet (**c**) gegenüber Gewebe aus dem cruralen (**a**) oder femoropoplitealen Stromgebiet (**b**). (Vergrößerung 20x, Messbalken 60 μ m)

4.4.2.4 Makrophagen

Der Anteil von Makrophagen am Gesamtquerschnitt der Atherektomie-Proben wurde mittels computergestützter Morphometrie an immunhistochemischen Färbungen (CD68) ermittelt. Hierbei zeigte sich eine Abhängigkeit des Anteils an Makrophagen vom kardiovaskulären Risikoprofil des Patienten, von der Läsionslokalisation sowie von der Länge des Zeitintervalls seit dem letzten Eingriff. Läsionen, bei denen an derselben Lokalisation bereits weniger als 50 Tage zuvor interveniert worden war, wiesen signifikant weniger Makrophagen auf als Läsionen, die länger als 300 Tage bestanden ($MW=0,096\% \pm 0,007$ gegenüber $MW=0,756 \pm 0,0$; $p<0,05$) (vgl. Diagramm 4.6). Eine Trennung nach Läsionsart zeigte hierbei aufgrund zu geringer Fallzahlen keine signifikanten Ergebnisse.



Das **Diagramm 4.6** zeigt den Anteil an Makrophagen (CD68) am Gesamtquerschnitt nach Zeitintervallen nach der letzten Intervention. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen frühen Läsionen (<50 Tage) und späten Läsionen (>300 Tage) (* $p < 0,05$).

Zudem konnte in Kollektiv 2 eine Abhängigkeit der Menge an Makrophagen im untersuchten Gewebe vom kardiovaskulären Risikoprofil des Patienten nachgewiesen werden. So fanden sich mehr Makrophagen bei adipösen Patienten ($MW = 1,37\% \pm 0,61$ gegenüber $MW = 0,47\% \pm 0,54$; $p < 0,05$), bei Rauchern ($MW = 1,67\% \pm 0,63$ gegenüber $MW = 0,88\% \pm 0,63$; $p = 0,057$), bei Patienten mit einer Niereninsuffizienz ($MW = 1,59\% \pm 0,52$ gegenüber $MW = 0,75\% \pm 0,63$; $p < 0,05$) sowie beim Vorliegen eines erhöhten CRP-Wertes ($MW = 1,35\% \pm 0,61$ gegenüber $MW = 0,53\% \pm 0,64$; $p < 0,05$).

Bei der Läsionslokalisation zeigte sich, dass Gewebe von Patienten, bei denen Läsionen sowohl im femoro-poplitealen als auch im cruralen Stromgebiet vorlagen, einen höheren Anteil an Makrophagen gegenüber Gewebe aufwies, das ausschließlich dem femoro-poplitealen oder dem femoro-poplitealen und iliakalen Stromgebiet entstammte ($MW = 1,53\% \pm 0,45$ gegenüber $MW = 0,58\% \pm 0,63$; $p < 0,05$). Gleichzeitig lagen bei erstgenannter Lokalisation erhöhte Entzündungsparameter vor (Leukozyten: $MW = 8240 \pm 953$ gegenüber $MW = 6140 \pm 410$; $p < 0,05$; CRP: $MW = 2 \pm 1$ gegenüber $MW = 0,28 \pm 0,096$; $p = 0,051$).

4.4.2.5 Kapillarisierung

Anhand der immunhistochemischen Färbung mit Antikörpern gegen CD34 wurden das Endothel neugebildeter Kapillaren sowie eine oberflächliche Endothelialisierung in den Atherektomie-Proben ermittelt. Hierbei zeigte sich in Kollektiv 2 ein vermehrter Nachweis einer Angiogenese bei Patienten mit Adipositas (MW=12% \pm 6 gegenüber MW=3% \pm 2; $p < 0,01$).

5 Diskussion

In der vorliegenden Dissertationsarbeit wurde sowohl der Einfluss von PPAR β/δ auf die experimentelle Restenose als auch die PPAR β/δ -Expression in humanem Gewebe untersucht. Es bestätigte sich dabei die Hypothese, dass PPAR β/δ eine Bedeutung für Atherosklerose und Restenose hat, und eine Aktivierung dieses Rezeptors in einer Verminderung der Restenose resultiert.

5.1 Methodenkritik

5.1.1 Tiermodell

Der Einfluss von PPAR β/δ auf die Restenoseentwicklung nach Stentimplantation wurde an einem Tiermodell mit New-Zealand-White-Kaninchen untersucht. Tiermodelle sind (in Ermangelung humanen Materials) wesentlicher Bestandteil der Erforschung von Atherosklerose und Restenose, die Übertragbarkeit auf den Menschen bleibt jedoch zu überprüfen. So weisen die oft im Tiermodell genutzten elastischen Arterien aus dem aortalen oder iliakalen Stromgebiet eine andere Struktur, Hydrodynamik und auch embryonalen Ursprung auf, als die im Menschen meist betroffenen kleinen bis mittelgroßen, muskulären Arterien, wie die Koronar- oder zerebralen Arterien (Libby et al. 2011). Das hier genutzte Tiermodell mit Kaninchenarterien stellt jedoch nach einem 2002 veröffentlichten Konsensus-Dokument (Schwartz et al. 2002) ein zuverlässiges Instrument zur präklinischen Untersuchung von Drug-eluting-Stents (DES) dar. Damit ist es neben koronaren Schweinearterien das einzig anerkannte Tiermodell, das aufgrund eines ähnlichen Gefäßkalibers und ähnlicher Gewebereaktion verglichen mit humanen Gefäßen eine präklinische Untersuchung der Reaktion auf Stents erlaubt.

Vorteile eines Tiermodells sind neben der Verfügbarkeit von atherosklerotischem und restenotischem Material vor allem die hohe Standardisierung in Bezug auf Vergleichbarkeit der Kollektive, der Stentlokalisation, der Stentart und der gewählten Zeitintervalle.

5.1.2 Humane Atherektomien

Atherektomien bieten die seltene Möglichkeit atherosklerotisches und restenotisches humanes Gewebe aus stenosierten Arterien in geeignetem Umfang zu analysieren.

Eines der wenigen Beispiele für die Verwendung von Atherektomien in der Erforschung der Restenose ist eine Studie von Kearney und Mitarbeitern (Kearney et al. 1997) zur Histopathologie der peripheren Restenose. Hierbei wurde ebenfalls das Gewebe aus peripheren Atherektomien genutzt, um es unter anderem durch immunhistochemische Färbungen zu charakterisieren. Der Nachteil gegenüber Tiermodellen, der auch in der vorliegenden Arbeit zum Tragen kam, ist die erschwerte Standardisierung im Sinne vergleichbarer Kollektive, in denen zu gleichen Zeitpunkten in gleicher Lokalisation Interventionen vorgenommen, und in denen im Fall der In-Stent-Restenose gleichartige Stents verwendet wurden. Zudem war es schwierig, Kollektive mit ausreichenden Follow-up-Daten zu erstellen, sodass zum Teil aufgrund zu niedriger Fallzahl keine signifikante Korrelation mit klinischen Daten erreicht werden konnte. Dennoch konnten in der vorliegenden Arbeit auf der Basis eines größeren Probenumfanges Beobachtungen gemacht werden.

5.2 Bedeutung von PPAR β/δ für Atherosklerose und Restenose

5.2.1 Einfluss von PPAR β/δ auf die Entwicklung restenotischer Läsionen

In der durchgeführten Untersuchung zeigte die Aktivierung von PPAR β/δ durch den synthetischen Agonisten GW0742 im Tiermodell eine signifikant geringere In-Stent-Restenosefläche und eine signifikant geringere proliferative Aktivität in der Restenose gegenüber der Kontrollgruppe.

Bereits Anfang der 1990er Jahre konnte durch Forrester und Mitarbeiter die Neointima-Hyperplasie als zentraler Pathomechanismus der Restenoseentstehung identifiziert werden. Schon damals prophezeite Forrester „*Resolution of restenosis probably requires both creation of the largest possible lumen and substantial inhibition of intimal hyperplasia*“ (Forrester et al. 1991). Auch heute noch geht man davon aus, dass die durch eine Migration und Proliferation glatter Muskelzellen der Gefäßwand bedingte Neointima-Hyperplasie der wesentliche Pathomechanismus insbesondere der In-Stent-Restenose ist (Costa und Simon 2005; Scott 2006). Histomorphologisch konnte dieses bei der Analyse des humanen Atherektomie-Materials belegt werden. Analog zu den Untersuchungen von Kearney und Mitarbeitern zeigte sich ein hoher Anteil glatter Muskelzellen im untersuchten Atherektomie-Gewebe, der in In-Stent-

Restenose- und Post-Interventions-Restenose-Läsionen höher war als in Denovo-Läsionen (Kearney et al. 1997).

Das Ausmaß der Neointima-Hyperplasie ist unter anderem abhängig von der Verletzung der Gefäßwand durch den interventionellen Eingriff, insbesondere des Endothels, und der konsekutiven Entzündungsreaktion der Gefäßwand (Libby et al. 2002; Schillinger und Minar 2005).

Intaktes Endothel hemmt zum einen die Aktivierung von Thrombozyten und die nachfolgende inflammatorische Reaktion der Gefäßwand, zum anderen hemmt es die Migration und Proliferation glatter Muskelzellen. Eine Schädigung des Endothels und die konsekutive Freilegung des darunter liegenden Gewebes führt dagegen zur Freisetzung von Chemokinen und Wachstumsfaktoren, die die Proliferation und Migration glatter Muskelzellen und damit die Neointima-Hyperplasie fördern (Costa und Simon 2005). Der Reaktion des Endothels nach Verletzung der Gefäßwand wurde daher in den letzten Jahren eine zunehmende Bedeutung beigemessen (Patel et al. 2010; Landmesser et al. 2004). In mehreren Studien konnte in vivo am Tiermodell eine Verminderung der Neointima-Hyperplasie und damit der Restenose durch eine schnellere Re-Endothelialisierung nachgewiesen werden (Bräsen et al. 2007; Werner et al. 2003; Tanous et al. 2006).

PPAR β/δ hat einen hemmenden Effekt auf inflammatorische Reaktionen des Endothels: In-vitro-Untersuchungen an humanen Endothelzellen konnten unter anderem eine Verminderung der TNF- α -induzierten Expression von VCAM-1 und E-Selectin sowie eine Verminderung der Leukozytenadhäsion durch die Applikation synthetischer PPAR β/δ -Agonisten nachweisen (Fan et al. 2008). Ähnliche Ergebnisse erzielten auch Piqueras und Mitarbeiter durch die Applikation eines synthetischen PPAR β/δ -Agonisten im Tiermodell an Mäusen. Hier zeigte sich ebenfalls eine Reduktion der TNF α -induzierten Leukozytenadhäsion, als auch eine Verminderung der Expression von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1, VCAM-1 und E-Selectin in postkapillären Venen (Piqueras et al. 2009).

In der vorliegenden Arbeit war im Tiermodell, anders als erwartet, bereits nach 14 Tagen eine vollständige Re-Endothelialisierung in allen Gruppen erreicht. Daher ließ sich der Effekt einer PPAR β/δ -Aktivierung auf die Restenoseentwicklung nicht direkt mit der Re-Endothelialisierung in Verbindung bringen.

Neben der inflammatorischen Reaktion des Endothels geht man heute davon aus, dass weitere lokale und systemische Entzündungsreaktionen einen Einfluss auf die

Entwicklung restenotischer Läsionen haben (Schillinger und Minar 2005): Bereits in den 1990er Jahren konnte ein Zusammenhang zwischen der Anzahl der Entzündungszellen in der Gefäßwand, insbesondere von Makrophagen und Monozyten, und dem Ausmaß der Neointima nachgewiesen werden (Rogers et al. 1996; Tanaka et al. 1993). Gestützt wird dieser Befund durch Untersuchungen von Farb und Mitarbeitern: Experimentell konnte eine Korrelation zwischen dem Ausmaß der Media-Verletzung durch den interventionellen Eingriff, dem Ausmaß der lokalen Entzündungsreaktion und der Neointima-Bildung gezeigt werden (Farb et al. 2002). Zudem wurde in mehreren Studien ein Anstieg der systemischen Entzündungsparameter nach vaskulärer Läsion in Abhängigkeit vom Ausmaß der Verletzung belegt (Schillinger et al. 2002; Schillinger und Minar 2005; Virmani und Farb 1999). In einer Untersuchung von Schillinger und Mitarbeitern wurde zudem der prädiktive Wert von CRP, Fibrinogen und der Leukozytenzahl hinsichtlich der 1-Jahres-Durchgängigkeit nach PTA im femoro-poplitealen Stromgebiet untersucht. Es zeigten sich zwar keine signifikanten Unterschiede, jedoch schien das CRP eine gewisse Vorhersagekraft zu haben (Schillinger et al. 2001).

Bei der Untersuchung des humanen Atherektomie-Gewebes in der vorliegenden Arbeit konnte ebenfalls eine Abhängigkeit der Läsionsmorphologie von systemischen Entzündungsparametern nachgewiesen werden. Erhöhte CRP-Spiegel im Serum sowie eine Leukozytose gingen mit einem deutlich erhöhten Makrophagen- und Fibrinanteil im untersuchten Gewebe einher.

Die Rolle von PPAR β/δ im Rahmen lokaler und systemischer Entzündungsreaktionen war in den letzten Jahren Gegenstand der Atherosklerose- und Restenoseforschung. Neben dem anti-inflammatorischen Einfluss auf das Endothel scheint PPAR β/δ auch inflammatorische Reaktionen von Monozyten/Makrophagen in der Gefäßwand zu supprimieren: In-vitro-Untersuchungen an Mäusen zeigten eine verminderte Aktivierung von proinflammatorischen Signalkaskaden in Makrophagen nach Applikation eines synthetischen PPAR β/δ -Agonisten. So kam es unter anderem zu einer Verminderung der Angiotensin-II-vermittelten Aktivierung der Mitogen-activated-Proteinkinase (MAP) p38 und der Extracellular-Signal-Regulated-Kinase (ERK) 1/2, zudem zu einer verminderten Expression der Chemokine MCP-1, CXCL-7 und CCL-21 (Takata et al. 2008; Barish et al. 2008; Welch et al. 2003). Zudem konnten Kim und Mitarbeiter kürzlich einen direkten Zusammenhang zwischen anti-inflammatorischen Effekten von PPAR β/δ und einer Reduktion der Proliferation glat-

ter Muskelzellen in vitro nachweisen: Im Rahmen einer In-vitro-Behandlung von glatten Muskelzellen aus Rattenarterien mit einem synthetischen PPAR β/δ -Agonisten zeigte sich, dass PPAR β/δ die IL-1 β -induzierte Migration und Proliferation glatter Muskelzellen durch die Hochregulation des IL-1-Rezeptorantagonisten (IL-1 Ra) supprimiert (Kim et al. 2010).

Daneben scheint PPAR β/δ auch einen direkt anti-proliferativen Effekt auf glatte Muskelzellen der Gefäßwand zu haben: Lim und Mitarbeiter untersuchten 2009 sowohl in vivo als auch in vitro die Aktivierung von PPAR β/δ durch den Agonisten L-165041 an Rattenarterien. Es zeigte sich zum einen in vitro eine dosisabhängige Verminderung der Proliferation glatter Muskelzellen, zum anderen in vivo eine verminderte Neointima-Hyperplasie nach Ballon-induzierter vaskulärer Läsion an Karotisarterien. Zugrunde liegender Mechanismus war eine Hemmung des Zellzyklus zwischen der G1- und S-Phase und eine Suppression der Phosphorylierung des Retinoblastom-Proteins (Rb) durch PPAR β/δ (Lim et al. 2009). Diese Ergebnisse bestätigten sich in der vorliegenden Arbeit anhand der immunhistochemischen Ki-67-Färbung auf proliferative Aktivität in der Restenose im Tiermodell. Hier zeigte sich eine signifikante Verminderung der Proliferation unter der Aktivierung von PPAR β/δ .

Zusammenfassend bestätigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit die aktuelle Studienlage hinsichtlich der anti-proliferativen und anti-inflammatorischen Effekte von PPAR β/δ . Erstmals konnte jedoch anhand dieses Tiermodells mittels PPAR β/δ -Agonist-beschichteter Stents ein direkter hemmender Effekt von PPAR β/δ auf restenotische Prozesse nachgewiesen werden bei gleichzeitig vorliegender verminderter proliferativer Aktivität und vollständiger Re-Endothelialisierung.

5.2.2 Hochregulation von PPAR β/δ nach vaskulärer Läsion

In der vorliegenden Arbeit konnte anhand immunhistochemischer Färbungen eine Hochregulation von PPAR β/δ zwei Wochen nach Stent-Implantation in humanen Koronararterien nachgewiesen werden. Die Untersuchung des humanen Atherektomie-Gewebes aus peripheren Arterien ergab interessanterweise eine höhere PPAR β/δ -Expression in Denovo- gegenüber In-Stent-Restenose-Läsionen.

Für eine Hochregulation von PPAR β/δ nach vaskulärer Läsion finden sich in der Literatur nur wenige Belege. In einer der wenigen Studien verglichen Zhang und Mitarbeiter 2002 die PPAR β/δ -Expression in VSMCs vor und nach Ballon-induzierter Ge-

fäßläsion. Hierbei zeigte sich eine signifikante Steigerung der PPAR β/δ -Expression in VCMCs im Rahmen der Neointima-Bildung (Zhang et al. 2002). Zudem ergaben mehrere Studien eine Hochregulation von PPAR γ nach Ballon-induzierter Gefäßläsion im Tiermodell: Qin und Mitarbeiter konnten anhand eines Tiermodells mit Schweinearterien sowohl in vitro als auch in vivo eine Steigerung der Expression von PPAR γ nach vaskulärer Läsion nachweisen (Qin et al. 2009). Zu ähnlichen Ergebnissen gelangten auch Lim und Mitarbeiter bei der Untersuchung von PPAR γ am In-vivo-Tiermodell mit Ratten. Hierbei führte eine Überexpression von PPAR γ nach Ballon-induzierter vaskulärer Läsion zu einer Verminderung der Restenose (Lim et al. 2006). Die Übertragbarkeit dieser Ergebnisse auf PPAR β/δ bleibt jedoch zu überprüfen. Prinzipiell haben aber sowohl PPAR β/δ , PPAR γ als auch PPAR α nachgewiesene ähnliche anti-inflammatorische Effekte an der Gefäßwand (Li et al. 2004; Bishop-Bailey und Bystrom 2009), sodass in der Zusammenschau mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit offenbar PPAR β/δ gleichsinnig hochreguliert wird. Zu diskutieren ist hierbei die höhere PPAR β/δ -Expression in humanen Denovo-Läsionen gegenüber In-Stent-Restenose- oder Post-Interventions-Läsionen. In den genannten Studien wurde ausschließlich gesunde, läsionsfreie Gefäßwand beziehungsweise VSMCs mit Gewebe nach vaskulärer Läsion verglichen. Bei den untersuchten humanen Denovo-Läsionen handelt es sich jedoch um atherosklerotisch verändertes Gewebe aus den in der Regel mechanisch stark belasteten Beinarterien. Zudem spielt vermutlich das Zeitintervall seit der letzten Intervention eine Rolle. Wie anhand der humanen Koronararterien gezeigt werden konnte, ist eine vermehrte PPAR β/δ -Expression nur in einem kurzen Zeitraum nach erfolgter Intervention nachweisbar. Aufgrund einer zu geringen Fallzahl konnte jedoch zu den entsprechenden unterschiedlichen Zeitpunkten keine Abhängigkeit der PPAR β/δ -Expression vom Zeitintervall nachgewiesen werden.

5.2.3 Expression von PPAR β/δ in humanem Atherektomie-Gewebe

Neben der bereits in Kap. 5.2.2 diskutierten Abhängigkeit der PPAR β/δ -Expression vom Läsionstyp zeigten sich bei der Untersuchung des humanen Atherektomie-Gewebes Unterschiede in der PPAR β/δ -Expression hinsichtlich des Patientenalters sowie des überwiegend betroffenen arteriellen Stromgebiets. So wies Gewebe von Patienten unter 60 Jahren eine signifikant höhere PPAR β/δ -Expression auf als Gewebe von Patienten über 80 Jahren. Ebenso war die PPAR β/δ -Expression bei Pati-

enten mit Läsionen sowohl im femoro-poplitealen als auch iliakalen Stromgebiet sowie im femoro-poplitealen als auch im cruralen Stromgebiet gegenüber Patienten mit ausschließlich Läsionen im femoro-poplitealen Stromgebiet höher. Es finden sich in der Literatur keine Untersuchungen an humanem Atherektomie-Gewebe, die eine Korrelation mit klinischen Daten einschließen, sodass die Interpretation der vorliegenden Ergebnisse ausschließlich auf Grundlage anderer Studien zu PPAR β/δ und der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit erfolgen kann. Da höhere PPAR β/δ -Expressionslevel bei tendenziell eher jüngeren Patienten beziehungsweise bei Patienten mit ausgedehnteren Befunden nachgewiesen wurden, wäre eine Korrelation der PPAR β/δ -Expression mit kardiovaskulären Risikofaktoren wie Entzündungsparametern, Diabetes mellitus, Nikotinabusus oder arteriellem Hypertonus zu hypothetisieren. Generell wird inflammatorischen Mechanismen eine zentrale Rolle bei der Entstehung und beim Verlauf der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit zugeordnet (Brevetti et al. 2010; Fowkes et al. 1992), wobei die genannten Risikofaktoren wiederum proinflammatorisch wirken (Hirsch et al. 2001; Baynes und Thorpe 1999; Pryor und Stone 1993; Murabito et al. 1997). Analog zu diesen Studien zeigte die vorliegende Untersuchung einen höheren Anteil von Makrophagen im Atherektomie-Gewebe sowohl beim Vorliegen der genannten Risikofaktoren als auch beim Nachweis erhöhter systemischer Entzündungsparameter. Zudem war der Anteil an Makrophagen im Gewebe von Patienten mit Läsionen sowohl im femoro-poplitealen als auch im cruralen Stromgebiet höher als bei Patienten mit Läsionen ausschließlich im femoro-poplitealen Stromgebiet. Diese Ergebnisse legen eine inflammatorische Reaktion bei den genannten Patientenkollektiven nahe, die möglicherweise mit einer erhöhten PPAR β/δ -Expression korreliert. Es konnte allerdings keine direkte Abhängigkeit der PPAR β/δ -Expression von kardiovaskulären Risikofaktoren oder erhöhten Entzündungsparametern nachgewiesen werden.

6 Zusammenfassung

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind die häufigste Todesursache in der westlichen Welt. Sie sind überwiegend atherosklerotisch bedingt und ihre Therapierbarkeit ist durch restenotische Prozesse limitiert.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des Transkriptionsfaktors PPAR β/δ auf die experimentelle Restenose anhand eines Kaninchen-Tiermodells charakterisiert, und zusätzlich die Expression von PPAR β/δ an einem Kollektiv von humanem Atherektomie-Gewebe aus Beinarterien untersucht.

Im Tiermodell wurden New-Zealand-White-Kaninchen PPAR β/δ -Agonisten-beschichtete Stents implantiert, wobei unbeschichtete Stents als Kontrollgruppe dienten. Im Vergleich zu den Kontrolltieren zeigte sich eine signifikant verminderte Restenosefläche und eine verminderte proliferative Aktivität in der Restenose bei gleichzeitig vollständiger Re-Endothelialisierung unter dem Einfluss des verwendeten synthetischen PPAR β/δ -Agonisten GW0742.

Um die Bedeutung von PPAR β/δ für atherosklerotische und restenotische Läsionen des Menschen zu charakterisieren, wurde humanes Atherektomie-Material von Patienten mit peripherer arterieller Verschlusskrankheit nach einem aufwändigen Aufbereitungsprozess histologisch untersucht. Zunächst zeigte sich kein wegweisender morphologischer Unterschied zwischen atherosklerotischen und restenotischen Läsionen. Lediglich mittels immunhistochemischer Markierung konnten Unterschiede in der Expression von PPAR β/δ nachgewiesen werden. So zeigte sich eine signifikant höhere PPAR β/δ -Expression in atherosklerotischen Denovo-Läsionen gegenüber In-Stent-Restenose-Läsionen. Zudem war die Expression bei Patienten mit einem Befall des iliakalen oder cruralen Stromgebietes stärker als bei Patienten mit einem ausschließlichen Befall des femoro-poplitealen Stromgebiets. Darüber hinaus korrelierte die PPAR β/δ -Expression mit kardiovaskulären Risikofaktoren wie einem Diabetes mellitus oder hohen Entzündungsparametern.

Zusammenfassend ergibt sich aus dieser Untersuchung, dass eine Aktivierung von PPAR β/δ einen hemmenden Einfluss auf die experimentelle In-Stent-Restenose hat.

In der humanen Atherosklerose und Restenose findet sich eine differenzierte Expression beziehungsweise Hochregulation von PPAR β/δ , die auf der Basis der experimentellen Daten einen potentiellen Therapieansatz darstellt.

7 Literaturverzeichnis

Barak, Y., Liao, D., He, W., Ong, E.S., Nelson, M.C., Olefsky, J.M., Boland, R., Evans, R.M. (2002): Effects of peroxisome proliferator-activated receptor delta on placentation, adiposity, and colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99, 303-308

Barish, G.D., Atkins, A.R., Downes, M., Olson, P., Chong, L.W., Nelson, M., Zou, Y., Hwang, H., Kang, H., Curtiss, L., Evans, R.M., Lee, C.H. (2008): PPARdelta regulates multiple proinflammatory pathways to suppress atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105, 4271-4276

Baynes, J.W., Thorpe, S.R. (1999): Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes*, 48, 1-9

Beckman, J.A., Creager, M.A., Libby, P. (2002): Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *JAMA*, 287, 2570-2581

Bishop-Bailey, D., Bystrom, J. (2009): Emerging roles of peroxisome proliferator-activated receptor-beta/delta in inflammation. *Pharmacol Ther*, 124, 141-150

Bosiers, M., Deloose, K., Callaert, J., Keirse, K., Verbist, J., Peeters, P. (2011a): Drug-eluting stents below the knee. *J Cardiovasc Surg (Torino)*, 52, 231-234

Bosiers, M., Scheinert, D., Peeters, P., Torsello, G., Zeller, T., Deloose, K., Schmidt, A., Tessarek, J., Vinck, E., Schwartz, L.B. (2011b): Randomized comparison of everolimus-eluting versus bare-metal stents in patients with critical limb ischemia and infrapopliteal arterial occlusive disease. *J Vasc Surg*, 55 (2), 390-398

Bräsen, J.H. (1994): Morphologische Analyse der Atherosklerose des WHHL-Kaninchens – unter besonderer Berücksichtigung von Oxidationsmechanismen – sowie der humanen Koronararteriosklerose. *Med. Diss., Hamburg*

Bräsen, J.H., Kivela, A., Roser, K., Rissanen, T.T., Niemi, M., Luft, F.C., Donath, K., Yla-Herttuala, S. (2001): Angiogenesis, vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor-BB expression, iron deposition, and oxidation-specific epitopes in stented human coronary arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 21, 1720-1726

Bräsen, J.H., Leppanen, O., Inkala, M., Heikura, T., Levin, M., Ahrens, F., Rutanen, J., Pietsch, H., Bergqvist, D., Levonen, A.L., Basu, S., Zeller, T., Klöppel, G., Laukkanen, M.O., Yla-Herttuala, S. (2007): Extracellular superoxide dismutase accelerates endothelial recovery and inhibits in-stent restenosis in stented atherosclerotic Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit aorta. *J Am Coll Cardiol*, 50, 2249-2253

Brevetti, G., Giugliano, G., Brevetti, L., Hiatt, W.R. (2010): Inflammation in peripheral artery disease. *Circulation*, 122, 1862-1875

Statistisches Bundesamt (2010): Gesundheit – Todesursachen in Deutschland. *Fachserie*, 12

- Chapman, M.J. (2006): Therapeutic elevation of HDL-cholesterol to prevent atherosclerosis and coronary heart disease. *Pharmacol Ther*, 111, 893-908
- Costa, M.A., Simon, D.I. (2005): Molecular basis of restenosis and drug-eluting stents. *Circulation*, 111, 2257-2273
- Dohmen, A., Eder, S., Euringer, W., Zeller, T., Beyersdorf, F. (2012): Chronic critical limb ischemia. *Dtsch Arztebl Int*, 109, 95-101
- Eckel, R.H., Wassef, M., Chait, A., Sobel, B., Barrett, E., King, G., Lopes-Virella, M., Reusch, J., Ruderman, N., Steiner, G., Vlassara, H. (2002): Prevention Conference VI: Diabetes and Cardiovascular Disease: Writing Group II: pathogenesis of atherosclerosis in diabetes. *Circulation*, 105, e138-143
- Fan, Y., Wang, Y., Tang, Z., Zhang, H., Qin, X., Zhu, Y., Guan, Y., Wang, X., Staels, B., Chien, S., Wang, N. (2008): Suppression of pro-inflammatory adhesion molecules by PPAR-delta in human vascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 28, 315-321
- Farb, A., Weber, D.K., Kolodgie, F.D., Burke, A.P., Virmani, R. (2002): Morphological predictors of restenosis after coronary stenting in humans. *Circulation*, 105, 2974-2980
- Farb, A., Kolodgie, F.D., Hwang, J.Y., Burke, A.P., Tefera, K., Weber, D.K., Wight, T.N., Virmani, R. (2004): Extracellular matrix changes in stented human coronary arteries. *Circulation*, 110, 940-947
- Feigelson, H.S., Criqui, M.H., Fronek, A., Langer, R.D., Molgaard, C.A. (1994): Screening for peripheral arterial disease: the sensitivity, specificity, and predictive value of noninvasive tests in a defined population. *Am J Epidemiol*, 140, 526-534
- Forrester, J.S., Fishbein, M., Helfant, R., Fagin, J. (1991): A paradigm for restenosis based on cell biology: clues for the development of new preventive therapies. *J Am Coll Cardiol*, 17, 758-769
- Fowkes, F.G., Housley, E., Riemersma, R.A., Macintyre, C.C., Cawood, E.H., Prescott, R.J., Ruckley, C.V. (1992): Smoking, lipids, glucose intolerance, and blood pressure as risk factors for peripheral atherosclerosis compared with ischemic heart disease in the Edinburgh Artery Study. *Am J Epidemiol*, 135, 331-340
- Fowkes, F.G., Murray, G.D., Butcher, I., Heald, C.L., Lee, R.J., Chambless, L.E., Folsom, A.R., Hirsch, A.T., Dramaix, M., deBacker, G., Wautrecht, J.C., Kornitzer, M., Newman, A.B., Cushman, M., Sutton-Tyrrell, K., Lee, A.J., Price, J.F., d'Agostino, R.B., Murabito, J.M., Norman, P.E., Jamrozik, K., Curb, J.D., Masaki, K.H., Rodriguez, B.L., Dekker, J.M., Bouter, L.M., Heine, R.J., Nijpels, G., Stehouwer, C.D., Ferrucci, L., McDermott, M.M., Stoffers, H.E., Hooi, J.D., Knottnerus, J.A., Ogren, M., Hedblad, B., Witteman, J.C., Breteler, M.M., Hunink, M.G., Hofman, A., Criqui, M.H., Langer, R.D., Fronek, A., Hiatt, W.R., Hamman, R., Resnick, H.E., Guralnik, J. (2008): Ankle brachial index combined with Framingham Risk Score to predict cardiovascular events and mortality: a meta-analysis. *JAMA*, 300, 197-208

Garcia, L.A., Lyden, S.P. (2009): Atherectomy for infrainguinal peripheral artery disease. *J Endovasc Ther*, 16, 1105-115

Graham, T.L., Mookherjee, C., Suckling, K.E., Palmer, C.N., Patel, L. (2005): The PPARdelta agonist GW0742X reduces atherosclerosis in LDLR(-/-) mice. *Atherosclerosis*, 181, 29-37

Hill, R., Bagust, A., Bakhai, A., Dickson, R., Dundar, Y., Haycox, A., Mujica Mota, R., Reaney, A., Roberts, D., Williamson, P., Walley, T. (2004): Coronary artery stents: a rapid systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess*, 8, iii-iv, 1-242

Hirsch, A.T., Criqui, M.H., Treat-Jacobson, D., Regensteiner, J.G., Creager, M.A., Olin, J.W., Krook, S.H., Hunninghake, D.B., Comerota, A.J., Walsh, M.E., McDermott, M.M., Hiatt, W.R. (2001): Peripheral arterial disease detection, awareness, and treatment in primary care. *JAMA*, 286, 1317-1324

Hirsch, A.T., Haskal, Z.J., Hertzner, N.R., Bakal, C.W., Creager, M.A., Halperin, J.L., Hiratzka, L.F., Murphy, W.R., Olin, J.W., Puschett, J.B., Rosenfield, K.A., Sacks, D., Stanley, J.C., Taylor, L.M., Jr., White, C.J., White, J., White, R.A., Antman, E.M., Smith, S.C., Jr., Adams, C.D., Anderson, J.L., Faxon, D.P., Fuster, V., Gibbons, R.J., Hunt, S.A., Jacobs, A.K., Nishimura, R., Ornato, J.P., Page, R.L., Riegel, B. (2006): ACC/AHA 2005 Practice Guidelines for the management of patients with peripheral arterial disease (lower extremity, renal, mesenteric, and abdominal aortic): a collaborative report from the American Association for Vascular Surgery/Society for Vascular Surgery, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, Society for Vascular Medicine and Biology, Society of Interventional Radiology, and the ACC/AHA Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Develop Guidelines for the Management of Patients With Peripheral Arterial Disease): endorsed by the American Association of Cardiovascular and Pulmonary Rehabilitation; National Heart, Lung, and Blood Institute; Society for Vascular Nursing; TransAtlantic Inter-Society Consensus; and Vascular Disease Foundation. *Circulation*, 113, e463-654

Inoue, T., Node, K. (2009): Molecular basis of restenosis and novel issues of drug-eluting stents. *Circ J*, 73, 615-621

Karnabatidis, D., Katsanos, K., Siablis, D. (2009): Infrapopliteal stents: overview and unresolved issues. *J Endovasc Ther*, 16 Suppl 1, 1153-162

Kearney, M., Pieczek, A., Haley, L., Losordo, D.W., Andres, V., Schainfeld, R., Rosenfield, K., Isner, J.M. (1997): Histopathology of in-stent restenosis in patients with peripheral artery disease. *Circulation*, 95, 1998-2002

Kim, H.J., Kim, M.Y., Hwang, J.S., Lee, J.H., Chang, K.C., Kim, J.H., Han, C.W., Seo, H.G. (2010): PPARdelta inhibits IL-1beta-stimulated proliferation and migration of vascular smooth muscle cells via up-regulation of IL-1Ra. *Cell Mol Life Sci*, 67, 2119-2130

Landmesser, U., Hornig, B., Drexler, H. (2004): Endothelial function: a critical determinant in atherosclerosis? *Circulation*, 109, 1127-33

- Lee, L.K., Kent, K.C. (2008): Infrainguinal occlusive disease: endovascular intervention is the first line therapy. *Adv Surg*, 42, 193-204
- Leibowitz, M.D., Fievet, C., Hennuyer, N., Peinado-Onsurbe, J., Duez, H., Bergera, J., Cullinan, C.A., Sparrow, C.P., Baffic, J., Berger, G.D., Santini, C., Marquis, R.W., Tolman, R.L., Smith, R.G., Moller, D.E., Auwerx, J. (2000): Activation of PPARdelta alters lipid metabolism in db/db mice. *FEBS Lett*, 473, 333-336
- Li, A.C., Binder, C.J., Gutierrez, A., Brown, K.K., Plotkin, C.R., Pattison, J.W., Valledor, A.F., Davis, R.A., Willson, T.M., Witztum, J.L., Palinski, W., Glass, C.K. (2004): Differential inhibition of macrophage foam-cell formation and atherosclerosis in mice by PPARalpha, beta/delta, and gamma. *J Clin Invest*, 114, 1564-1576
- Libby, P., Ridker, P.M., Maseri, A. (2002): Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*, 105, 1135-1143
- Libby, P. (2003): Vascular biology of atherosclerosis: overview and state of the art. *Am J Cardiol*, 91, 3A-6A
- Libby, P., Aikawa, M., Jain, M.K. (2006): Vascular endothelium and atherosclerosis. *Handb Exp Pharmacol*, 285-306
- Libby, P. (2009): Molecular and cellular mechanisms of the thrombotic complications of atherosclerosis. *J Lipid Res*, 50 Suppl, S352-357
- Libby, P., Ridker, P.M., Hansson, G.K. (2011): Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature*, 473, 317-325
- Lim, H.J., Lee, S., Park, J.H., Lee, K.S., Choi, H.E., Chung, K.S., Lee, H.H., Park, H.Y. (2009): PPAR delta agonist L-165041 inhibits rat vascular smooth muscle cell proliferation and migration via inhibition of cell cycle. *Atherosclerosis*, 202, 446-454
- Lim, S., Jin, C.J., Kim, M., Chung, S.S., Park, H.S., Lee, I.K., Lee, C.T., Cho, Y.M., Lee, H.K., Park, K.S. (2006): PPARgamma gene transfer sustains apoptosis, inhibits vascular smooth muscle cell proliferation, and reduces neointima formation after balloon injury in rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 26, 808-813
- Liou, J.Y., Lee, S., Ghelani, D., Matijevic-Aleksic, N., Wu, K.K. (2006): Protection of endothelial survival by peroxisome proliferator-activated receptor-delta mediated 14-3-3 upregulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 26, 1481-1487
- Minar, E. (2011): Drug-eluting stents above the knee. *J Cardiovasc Surg (Torino)*, 52, 225-229
- Moses, J.W., Leon, M.B., Popma, J.J., Fitzgerald, P.J., Holmes, D.R., O'Shaughnessy, C., Caputo, R.P., Kereiakes, D.J., Williams, D.O., Teirstein, P.S., Jaeger, J.L., Kuntz, R.E. (2003): Sirolimus-eluting stents versus standard stents in patients with stenosis in a native coronary artery. *N Engl J Med*, 349, 1315-1323

- Murabito, J.M., D'Agostino, R.B., Silbershatz, H., Wilson, W.F. (1997): Intermittent claudication. A risk profile from The Framingham Heart Study. *Circulation*, 96, 44-49
- Norgren, L., Hiatt, W.R., Dormandy, J.A., Nehler, M.R., Harris, K.A., Fowkes, F.G., Bell, K., Caporusso, J., Durand-Zaleski, I., Komori, K., Lammer, J., Liapis, C., Novo, S., Razavi, M., Robbs, J., Schaper, N., Shigematsu, H., Sapoval, M., White, C., White, J., Clement, D., Creager, M., Jaff, M., Mohler, E., 3rd, Rutherford, R.B., Sheehan, P., Sillesen, H., Rosenfield, K. (2007): Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 33 Suppl 1, S1-75
- Patel, S.D., Waltham, M., Wadoodi, A., Burnand, K.G., Smith, A. (2010): The role of endothelial cells and their progenitors in intimal hyperplasia. *Ther Adv Cardiovasc Dis*, 4, 129-141
- Peters, J.M., Lee, S.S., Li, W., Ward, J.M., Gavrilova, O., Everett, C., Reitman, M.L., Hudson, L.D., Gonzalez, F.J. (2000): Growth, adipose, brain, and skin alterations resulting from targeted disruption of the mouse peroxisome proliferator-activated receptor beta(delta). *Mol Cell Biol*, 20, 5119-5128
- Piqueras, L., Sanz, M.J., Perretti, M., Morcillo, E., Norling, L., Mitchell, J.A., Li, Y., Bishop-Bailey, D. (2009): Activation of PPARbeta/delta inhibits leukocyte recruitment, cell adhesion molecule expression, and chemokine release. *J Leukoc Biol*, 86, 115-122
- Pryor, W.A., Stone, K. (1993): Oxidants in cigarette smoke. Radicals, hydrogen peroxide, peroxyxynitrate, and peroxyxynitrite. *Ann N Y Acad Sci*, 686, 12-27; discussion 27-18
- Qin, H.D., Huang, D., Weng, X.D., Xu, F. (2009): Upregulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and NADPH oxidases are involved in restenosis after balloon injury. *J Cell Physiol*, 221, 387-393
- Rogers, C., Welt, F.G., Karnovsky, M.J., Edelman, E.R. (1996): Monocyte recruitment and neointimal hyperplasia in rabbits. Coupled inhibitory effects of heparin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 16, 1312-1318
- Rogers, J.H., Laird, J.R. (2007): Overview of new technologies for lower extremity revascularization. *Circulation*, 116, 2072-2085
- Roiron, C., Sanchez, P., Bouzamondo, A., Lechat, P., Montalescot, G. (2006): Drug eluting stents: an updated meta-analysis of randomised controlled trials. *Heart*, 92, 641-649
- Romeis, B., Boeck, P. (1989): *Mikroskopische Technik*. 17., neubearb. Aufl., Urban & Schwarzenberg, Muenchen [u.a.]
- Schillinger, M., Haumer, M., Schlerka, G., Mlekusch, W., Exner, M., Ahmadi, R., Minar, E. (2001): Restenosis after percutaneous transluminal angioplasty in the femoropopliteal segment: the role of inflammation. *J Endovasc Ther*, 8, 477-483

Schillinger, M., Exner, M., Mlekusch, W., Haumer, M., Ahmadi, R., Rumpold, H., Wagner, O., Minar, E. (2002): Balloon angioplasty and stent implantation induce a vascular inflammatory reaction. *J Endovasc Ther*, 9, 59-66

Schillinger, M., Minar, E. (2005): Restenosis after percutaneous angioplasty: the role of vascular inflammation. *Vasc Health Risk Manag*, 1, 73-78

Schwartz, R.S., Edelman, E.R., Carter, A., Chronos, N., Rogers, C., Robinson, K.A., Waksman, R., Weinberger, J., Wilensky, R.L., Jensen, D.N., Zuckerman, B.D., Virmani, R. (2002): Drug-eluting stents in preclinical studies: recommended evaluation from a consensus group. *Circulation*, 106, 1867-1873

Scott, N.A. (2006): Restenosis following implantation of bare metal coronary stents: pathophysiology and pathways involved in the vascular response to injury. *Adv Drug Deliv Rev*, 58, 358-376

Sprecher, D.L., Massien, C., Pearce, G., Billin, A.N., Perlstein, I., Willson, T.M., Hassall, D.G., Ancellin, N., Patterson, S.D., Lobe, D.C., Johnson, T.G. (2007): Triglyceride:high-density lipoprotein cholesterol effects in healthy subjects administered a peroxisome proliferator activated receptor delta agonist. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 27, 359-365

Takata, Y., Liu, J., Yin, F., Collins, A.R., Lyon, C.J., Lee, C.H., Atkins, A.R., Downes, M., Barish, G.D., Evans, R.M., Hsueh, W.A., Tangirala, R.K. (2008): PPARdelta-mediated antiinflammatory mechanisms inhibit angiotensin II-accelerated atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105, 4277-4282

Tan, N.S., Michalik, L., Noy, N., Yasmin, R., Pacot, C., Heim, M., Fluhmann, B., Desvergne, B., Wahli, W. (2001): Critical roles of PPAR beta/delta in keratinocyte response to inflammation. *Genes Dev*, 15, 3263-3277

Tanaka, H., Sukhova, G.K., Swanson, S.J., Clinton, S.K., Ganz, P., Cybulsky, M.I., Libby, P. (1993): Sustained activation of vascular cells and leukocytes in the rabbit aorta after balloon injury. *Circulation*, 88, 1788-1803

Tanous, D., Bräsen, J.H., Choy, K., Wu, B.J., Kathir, K., Lau, A., Celermajer, D.S., Stocker, R. (2006): Probucol inhibits in-stent thrombosis and neointimal hyperplasia by promoting re-endothelialization. *Atherosclerosis*, 189, 342-349

Virmani, R., Farb, A. (1999): Pathology of in-stent restenosis. *Curr Opin Lipidol*, 10, 499-506

vom Dahl, J., Dietz, U., Haager, P.K., Silber, S., Niccoli, L., Buettner, H.J., Schiele, F., Thomas, M., Commeau, P., Ramsdale, D.R., Garcia, E., Hamm, C.W., Hoffmann, R., Reineke, T., Klues, H.G. (2002): Rotational atherectomy does not reduce recurrent in-stent restenosis: results of the angioplasty versus rotational atherectomy for treatment of diffuse in-stent restenosis trial (ARTIST). *Circulation*, 105, 583-588

Wang, N. (2008): PPAR-delta in Vascular Pathophysiology. *PPAR Res*, 2008, 164163

Weisz, G., Leon, M.B., Holmes, D.R., Jr., Kereiakes, D.J., Popma, J.J., Teirstein, P.S., Cohen, S.A., Wang, H., Cutlip, D.E., Moses, J.W. (2009): Five-year follow-up after sirolimus-eluting stent implantation results of the SIRIUS (Sirolimus-Eluting Stent in De-Novo Native Coronary Lesions) Trial. *J Am Coll Cardiol*, 53, 1488-1497

Welch, J.S., Ricote, M., Akiyama, T.E., Gonzalez, F.J., Glass, C.K. (2003): PPARgamma and PPARdelta negatively regulate specific subsets of lipopolysaccharide and IFN-gamma target genes in macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100, 6712-6717

Welt, F.G., Rogers, C. (2002): Inflammation and restenosis in the stent era. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 22, 1769-1776

Werner, N., Junk, S., Laufs, U., Link, A., Walenta, K., Bohm, M., Nickenig, G. (2003): Intravenous transfusion of endothelial progenitor cells reduces neointima formation after vascular injury. *Circ Res*, 93, e17-24

Zhang, J., Fu, M., Zhu, X., Xiao, Y., Mou, Y., Zheng, H., Akinbami, M.A., Wang, Q., Chen, Y.E. (2002): Peroxisome proliferator-activated receptor delta is up-regulated during vascular lesion formation and promotes post-confluent cell proliferation in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*, 277, 11505-11512

8 Anhang

8.1 Einbettungsprotokolle

8.1.1 Technovit® 9100 NEU

Vorbehandlung des in 4%-igem Formalin neutral gepufferten Gewebes:

Entwässerung 1	Ethanol	70%	1h
Entwässerung 2	Ethanol	80%	1h
Entwässerung 3	Ethanol	96%	1h
Entwässerung 4	Ethanol	96%	1h
Entwässerung 5	Ethanol	96%	1h
Entwässerung 6	Ethanol	100%	1h
Entwässerung 7	Ethanol	100%	1h
Intermedium 1	Xylol		1h
Intermedium 2	Xylol		1h
Präinfiltration 1	Xylol/Technovit® 9100 NEU Basis (stabilisiert)	50%	1h
Präinfiltration 2	Technovit® 9100 NEU Basis (stabilisiert) + Härter 1		1h
Präinfiltration 3	Technovit® 9100 NEU Basis (entstabilisiert) + Härter 1 (im Kühlschrank bei 4°C)		1h
Infiltration	Technovit® 9100 NEU Basis (entstabilisiert) + Härter 1 + PMMA-Pulver (im Kühlschrank bei 4°C)		1h bis 2-3 d

Ansetzen der Polymerisationslösungen:

Mischung der gekühlten Stammlösungen unmittelbar vor Gebrauch im Verhältnis 9 Teile Stammlösung A zu 1 Teil Stammlösung B in einem Becherglas.

Durchführung der Polymerisation s. 3.3.2.1

8.2 Färbeprotokolle

8.2.1 PBS

2 l Aqua dest. (DeltaSelect, Dreieich, Deutschland) +
14,02 g NaCl (Merck, Darmstadt, Deutschland) +
4,62 g Na₂HPO₄ (Merck, Darmstadt, Deutschland) +
0,82 g KH₂PO₄ (Merck, Darmstadt, Deutschland)

8.2.2 DAB

2 ml Aqua dest. (Vector Laboratories, Burlingame, USA) +
40 µl Puffer (Vector Laboratories, Burlingame, USA) +
40 µl DAB (Vector Laboratories, Burlingame, USA) +
40 µl Hydrogenperoxidase (Vector Laboratories, Burlingame, USA)

8.2.3 TUNEL-Methode (R&D Systems, Minneapolis, USA)

1. Applikation von 50 µl Proteinkinase-K-Lösung (R&D Systems, Minneapolis, USA) für 15 min
2. Waschen in DNase-freiem Wasser
3. Blockung der endogenen Peroxidase in Methanol und H₂O₂ 30% (1:9) für 5 min
4. TdT Labeling: Applikation von 50 µl des Labeling Reaction Mix (TdT-dNTP, 50x Cation Stock, TdT Enzym, 1x Tdt Labeling Puffer (alle R&D Systems, Minneapolis, USA)) für 1 h bei 37°C im Inkubator in der Feuchtkammer
5. Waschen im TdT Stop Puffer (R&D Systems, Minneapolis, USA) für 5 min
6. Zweimaliges Waschen in PBS

7. Applikation von 50 µl der Streptavidin-HRP-Detection-Lösung (R&D Systems, Minneapolis, USA) und bei Raumtemperatur für 10 min inkubieren.
8. Zweimaliges Waschen in PBS
9. Applikation von DAB Working Solution (R&D Systems, Minneapolis, USA) und Beurteilung des Färbeprozesses unter dem Mikroskop (2-10 min)
10. Stoppen der Reaktion in Aqua dest.
11. Spülen in Leitungswasser
12. Gegenfärbung in Methyl-Grün (5 s - 5 min)
13. Stoppen der Reaktion in destilliertem Wasser
14. Aufsteigende Alkoholreihe
15. Eindeckeln der Objektträger mit Deckgläschen

8.2.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

1. Entparaffinieren in Xylol (2x 10 min) und absteigender Alkoholreihe (100%, 100%, 96%, 96%, 70%, fließendes Leitungswasser, Aqua dest.)
2. Färbung in Hämalun (Merck, Darmstadt, Deutschland) für 10 min
3. Differenzieren in HCL-Alkohol
4. Wässern unter fließendem warmen Wasser und Spülen in Aqua dest.
5. Eintauchen in Eosin (Eosin G Certistain[®] Merck, Darmstadt, Deutschland) für 5 min (Herstellung des Eosins: 17g Eosin auf 1 l 96%-igem Ethanol angesetzt und pro Küvette mit 1 ml konzentrierter Essigsäure versetzt)
6. Aufsteigende Alkoholreihe und Eindeckeln mit Eukitt[®] (Kindler, Freiburg, Deutschland)

8.2.5 Kombinierte Masson-Goldner-, Elastika-van Gieson-, von Kossa-Färbung

1. Kossa-Färbung: Inkubation in 5% Silbernitrat (Merck, Darmstadt, Deutschland) für 30 min
2. Spülen in Aqua dest.
3. Reduktion mit 1% Hydrochinon und 5% Natriumsulfit für 2 min
4. Spülen in Aqua dest.

-
5. Fixation in 5% wässriger Natriumthiosulfat-Lösung (Merck, Darmstadt, Deutschland) für 2 min
 6. Elastika-Färbung: Einbringen der Gewebeschnitte in Resorzin-Fuchsin nach Weigert (Chroma, Köngen, Deutschland) für 2 min
 7. Spülen in fließendem Wasser für 1 min
 8. Fixation in 80% Ethanol
 9. Kombinierte Masson-Goldner-Trichrom-Färbung: Zunächst Kernfärbung in Weigerts Eisenhämatoxylin für 2 min
 10. Spülen in fließendem Wasser
 11. Eintauchen in Ponceau-Säurefuchsin-Azophloxin für 5 min
 12. Spülen in 1% Essigsäure.
 13. Differenzierung in Orange-G-Lösung (2% Phosphorwolframsäure (Merck, Darmstadt, Deutschland) und 2% Orange-G (Chroma, Köngen, Deutschland) für 2 min
 14. Spülen in 1% Essigsäure
 15. Gegenfärbung mit 0,5% Lichtgrün (Merck, Darmstadt, Deutschland) in 0,2% Essigsäure für 5 min

Danksagung

Zuallererst möchte ich mich bei meinem Doktorvater PD Dr. Bräsen bedanken, von dem die Idee zu dieser Arbeit stammt und der mir jederzeit unterstützend mit Rat und Tat und nicht zuletzt moralischer Ermunterung zur Seite stand.

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Röcken für die Möglichkeit in seinem Institut promovieren zu dürfen.

Ein besonderer Dank gilt Frau Iversen für ihre fortwährende Unterstützung und fachliche Begleitung meiner Arbeit.

Frau Pacena und Frau Hauberg sowie den weiteren Mitarbeitern des immunhistochemischen Labors gilt ebenfalls mein Dank für ihre Unterstützung meiner Arbeit mit fachlicher Hilfe und vielen nützlichen Ratschlägen.

Ich bedanke mich zudem bei Prof. Dr. Klapper für die Unterstützung seines Labors bei den fluoreszenz-gekoppelten Mehrfachmarkierungen.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Prof. Dr. Açı̇l für seine Erlaubnis, das Forschungslabor der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie mitbenutzen zu dürfen, und Frau Nessenius für ihre fachliche Unterstützung dort.

Zudem möchte ich mich an dieser Stelle bei meinen Eltern bedanken, die mir mein Studium ermöglichten und mir während der gesamten Zeit immer unterstützend zur Seite standen.

Erklärung

„Ich, Marlen Wilhelm, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift selbst und ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst habe, keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Kiel, 14.02.2013

Marlen Wilhelm

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name	Marlen Wilhelm
Geburtsdatum	10. August 1986
Geburtsort	Lüneburg
Nationalität	Deutsch

Berufliche Tätigkeit

seit März 2013	Assistenzärztin am Schwarzwald-Baar-Klinikum Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie (Prof. Dr. Dr. h.c. Runkel) Villingen-Schwenningen
----------------	--

Studium

2006 - 2012	Medizinstudium an der Christian-Albrechts-Universität Kiel
2012	Staatsexamen Humanmedizin
2011 - 2012	Praktisches Jahr
2008	Physikum

Schulbildung

2006	Abitur
1999 - 2006	Wilhelm-Raabe-Gymnasium, Lüneburg
2003 - 2004	Yeppoon State High School, Australien